

**Mechanismen zur Induktion von
CD8⁺ T-Zell-vermittelter Toleranz und Immunität
in der intestinalen Mukosa**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie und Geografie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Diana Fleissner

aus Leipzig
Februar 2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof.‘in Dr. A.M. Westendorf

2. Gutachter: Prof. Dr. J.F. Schlaak

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. J.W. Fischer

Tag der Disputation: 16. Juni 2010

„Die Technik von heute ist das Brot von morgen –
die Wissenschaft von heute ist die Technik von morgen.“

Richard von Weizsäcker (*1920), dt. Politiker (CDU), 1984-94 Bundespräsident

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	10
1.1 Das mukosale intestinale Immunsystem	10
1.1.1 Barrieren und unspezifische Abwehrmechanismen	10
1.1.2 Das Darm-assoziierte lymphoide Gewebe (GALT)	11
1.1.3 Antigenaufnahme – immunologische Überwachung des luminalen Inhalts	14
1.1.4 T-Zell-vermittelte Immunreaktionen in der intestinalen Mukosa	16
1.1.4.1 Inflammatorische T _H 1-Immunantwort	17
1.1.4.2 Humorale T _H 2-Immunantwort	18
1.1.4.3 T _H 17-Immunantwort	19
1.1.4.4 CD8 ⁺ Effektor-T-Zell-vermittelte Immunantwort	20
1.1.4.5 Regulatorische Immunantwort	21
1.1.5 Mechanismen zur Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase	21
1.2 Regulatorische T-Zellen	26
1.2.1 Natürliche CD4 ⁺ Tregs	26
1.2.2 Natürliche CD8 ⁺ Tregs	27
1.2.3 Induzierte Tregs (iTregs)	28
1.2.4 Induktion von Tregs in der intestinalen Mukosa	28
1.2.5 Suppressionsmechanismen von Tregs	33
1.2.6 Bedeutung von Tregs zur Aufrechterhaltung intestinaler Homöostase	36

1.3 Zielsetzung der Arbeit	38
2 Material und Methoden	40
2.1 Mauslinien	40
2.2 Patienten	41
2.3 Molekularbiologische Methoden	41
2.3.1 Detektion transgener Mäuse	41
2.3.2 Expressionsanalysen mittels quantitativer Real-Time RT-PCR	42
2.3.3 Transkriptomanalysen	44
2.3.4 DNA-Methylierungsstudie im <i>foxp3</i> Genlocus	45
2.4 Zellbiologische Methoden	47
2.4.1 Antikörper und Durchflusszytometrie	47
2.4.2 Sortieren von Zellpopulationen mit der Durchflusszytometrie	48
2.4.3 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen	48
2.4.4 Isolierung von CD8 ⁺ oder CD4 ⁺ T-Zellen	50
2.4.5 Isolierung von Dendritischen Zellen	51
2.4.6 Induktion von CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i>	51
2.4.7 CFSE-Markierung von Lymphozyten	52
2.4.8 Proliferationstests	52
2.4.9 Inhibitionstest <i>in vitro</i>	53
2.4.10 Bestimmung von intrazellulären Zytokinen	53

2.4.11 Bestimmung von sezernierten Zytokinen	54
2.5 Tierexperimentelle Methoden	54
2.5.1 Intravenöse Injektion von T-Zellen	54
2.5.2 Operative Entfernung von mesenterischen Lymphknoten	54
2.5.3 Orale Applikation von FTY720	55
2.5.4 Kontakthypersensibilitätsmodell	55
2.6 Histologie	55
3 Ergebnisse	58
3.1 Untersuchung der Aktivierung von Darmantigen-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgenen Mäusen	58
3.1.1 Rolle von mesenterischen Lymphknoten bei der Aktivierung von CD8 ⁺ T-Zellen	58
3.1.2 Rolle der Peyer'schen Platten und Lamina propria bei der Aktivierung von HA-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgenen Mäusen	61
3.2 Induktion von CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen	65
3.2.1 Induktion von CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen <i>in vivo</i>	65
3.2.2 Induktion von CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i>	67
3.2.3 TGF- β /Retinsäure vermittelte Induktion von CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i>	69
3.2.4 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von TGF- β /RA-induzierten CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen	70

3.2.4.1	Transkriptomanalyse von TGF- β /RA-induzierten CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen	71
3.2.4.2	Expression von Treg-spezifischen Markermolekülen	78
3.2.4.3	Expression von zytotoxischen CD8 ⁺ Effektormolekülen	80
3.2.4.4	Induktion von Darm-spezifischen Migrationsmolekülen	82
3.2.4.5	Methylierungsanalyse von TGF- β /RA-induzierten CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ /GFP ⁺ T-Zellen	82
3.2.4.6	Zytokinprofil von TGF- β /RA-induzierten CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ /GFP ⁺ T-Zellen	84
3.2.4.7	Immunsuppressives Potential von TGF- β /RA-induzierten CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	86
3.2.5	Regulatorische CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen im Humansystem	91
3.2.5.1	CD8 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen bei CEDE	91
3.2.5.2	TGF- β /RA-vermittelte Induktion von humanen CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i>	92
3.2.5.3	Immunsuppressives Potential von TGF- β /RA-induzierten humanen CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i>	94
4	Diskussion	97
4.1	Aktivierung Darmantigen-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen in der intestinalen Mukosa	97
4.2	Induktion von CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ Tregs in der intestinalen Mukosa	101
5	Zusammenfassung	111
6	Literatur	114

7	Abkürzungsverzeichnis	130
----------	------------------------------	-----

8	Abbildungsverzeichnis	134
----------	------------------------------	-----

9	Tabellenverzeichnis	137
----------	----------------------------	-----

10	Anlagen	139
-----------	----------------	-----

Publikationen und Tagungsbeiträge

Erklärung

EINLEITUNG

1 Einleitung

1.1 Das mukosale intestinale Immunsystem

Der Darm, insbesondere die Darmschleimhaut, stellt mit ca. 400 m² Oberfläche die größte Grenzfläche zwischen Organismus und Umwelt dar und ist wie keine andere Körperoberfläche einer Unzahl von Antigenen ausgesetzt, die für den Gesamtorganismus potentiell schädlich sein können. Von physiologischer Bedeutung ist, dass zwei entgegengesetzte Funktionen im Darm ausgeübt werden. Einerseits muss die Aufnahme benötigter Nährstoffe erfolgen, andererseits müssen körperfremde luminale Antigene und potentielle pathogene Erreger abgewehrt werden. Pathogene Faktoren müssen mit hoher Selektivität eliminiert werden, während apathogene Substanzen, Bestandteile der über 400 verschiedenen Arten von Mikroorganismen der natürlichen Darmflora sowie körpereigene Antigene toleriert werden müssen. Als Konsequenz hat sich ein Darmimmunsystem entwickelt, das mehr als 70 % der gesamten Abwehrzellen des Körpers, darunter mehrere darmspezifische Subpopulationen, beinhaltet. Dieses kann weitestgehend unabhängig vom peripheren Immunsystem reagieren und ist unter physiologischen Bedingungen in der Lage, einen strikt geregelten Gleichgewichtszustand im Organismus aufrechtzuerhalten. Dies gelingt, weil regulatorische Mechanismen eine überschießende Immunreaktion verhindern und dennoch die Fähigkeit zur schnellen, adäquaten Immunantwort im Bedarfsfall aufrechterhalten bleibt. Zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichtszustandes, der intestinalen Homöostase, haben sich im Laufe der Phylogenese im Darm Strukturen entwickelt, die diese Funktionen wahrnehmen. Sie lassen sich in mechanische Barrieren, unspezifische Abwehrmechanismen und das wesentlich komplexere, spezifische Darm-assoziierte Immunsystem (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*) unterteilen (reviewed in Mayer *et al.*, 2005).

1.1.1 Barrieren und unspezifische Abwehrmechanismen

Die intestinale Epithelschicht stellt die erste wichtige Barriere, die *first line of defense*, zum Schutz des Organismus gegen eindringende Pathogene dar. Obwohl sie nur

aus einer einzigen Zellschicht besteht, wird der Eintritt von Antigenen aus dem Darmlumen strikt kontrolliert und deren irregulärer Zutritt verhindert (Baumgart *et al.*, 2002). Stark adhäsive Zell-Zellkontakte, sogenannte *tight junctions* (engl. feste Verbindungen), schweißen die intestinalen Epithelzellen (IEC, *intestinal epithelial cell*) eng zusammen und verwehren im Allgemeinen auch sehr kleinen Molekülen den Durchtritt durch die Darmwand (Ukena *et al.*, 2007; Ukena *et al.*, 2005; Shen und Turner *et al.*, 2006; Madara *et al.*, 1998). In die Epithelzellschicht eingebettet liegen Mukus-bildende Becherzellen. Die auf dem Epithel aufgelagerte Mukusschicht bildet eine zusätzliche mechanische Barriere. Die Glykocalyx - eine Schicht komplexer Kohlenhydrate, die die Mikrovilli bedeckt und mit der Epithelzelloberfläche verknüpft ist - stellt neben der Mukusschicht eine weitere äußere Barriere der Mukosa dar. Diese dient neben dem Schutz der Mukosa auch zur Anlagerung von Nahrungsmittelbestandteilen und intestinalen Proteasen, so dass die Glykocalyx auch eine wesentliche Funktion bei der Nährstoffaufnahme ausübt (Patsos *et al.*, 2009). Ebenfalls wichtig für den Schutz der Darmschleimoberfläche gegen invasive Erreger sind antimikrobielle Peptide, wie beispielsweise Defensine, und bakteriolytische Enzyme, welche von Paneth-Zellen und IECs sezerniert werden (Müller *et al.*, 2005). Von IECs und Plasmazellen sezernierte Immunglobulin (Ig) A-Antikörper übernehmen ebenfalls eine wichtige Funktion bei der unspezifischen Erregerabwehr, indem sie bakterielle Toxine und Pathogene binden, in der Mukusschicht verankern und dadurch die Penetration durch das Darmepithel verhindern. Da lösliches IgA nicht an Rezeptoren der Komplementkaskade bindet, wird keine inflammatorische Reaktion ausgelöst (Macpherson *et al.*, 2008; Farstad *et al.*, 2000). Auch die 10^{14} Mikroorganismen der natürlichen Darmflora tragen zum Schutz vor Pathogenen bei, indem sie die Bindungsstellen für Pathogene okkupieren und somit opportunistischen Pathogenen die Kolonisierung des Darms erschweren (Duerkop *et al.*, 2009). Ein weiterer unspezifischer Abwehrmechanismus ist die spontane Diarrhö als Antwort auf z.B. Salmonellen oder den Verzehr von verdorbenen Lebensmitteln. Durch Steigerung der Wasserzufuhr und der Darmperistaltik führt die rasche Entleerung des Darmlumens zur Elimination der Krankheitserreger.

1.1.2 Das Darm-assoziierte lymphoide Gewebe (GALT)

Neben den mechanischen und chemischen Barrieren hat sich im Laufe der Evolution zum Schutz vor Pathogenen ein zelluläres Darmimmunsystem entwickelt

(Bienenstock und Perey *et al.*, 1972). Das GALT (Abb. 1-1) umfasst mehr Immunzellen als jedes andere sekundäre Lymphorgan und ist somit das größte immunologische Organ des Körpers (Beagley und Elson *et al.*, 1992).

Das GALT kann räumlich und funktionell in zwei Kompartimente, den induktiven und efferenten Teil, unterteilt werden. Im induktiven Teil des GALT erfolgt die Induktion einer Immunantwort, die im efferenten Teil von den aktivierten Effektorzellen ausgeführt wird. Grundvoraussetzung für die Induktion einer Immunantwort ist der direkte Zell-Zell-Kontakt zwischen einer antigen-präsentierenden Zelle (APC, *antigen presenting cell*), wie der Dendritischen Zelle (DC, *dendritic cell*), Makrophage und B-Zelle, und einer antigen-spezifischen T-Zelle. DCs prozessieren aufgenommene Antigene und präsentieren diese auf ihrer Zelloberfläche in Fragmentform über Haupthistokompatibilitäts- (MHC, *major histocompatibility complex*) Klasse I- oder II-Moleküle naiven antigen-spezifischen T-Zellen und induzieren somit eine T-Zell-vermittelte Immunantwort. Um die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens zwischen APC und seltener antigen-spezifischen T-Zelle zu erhöhen und somit schnell eine Immunantwort zu induzieren, haben sich organisierte sekundäre lymphatische Gewebe wie die Milz und der Lymphknoten entwickelt.

Im Darm erfolgt die Induktion von Immunantworten überwiegend in den darm-drainierenden mesenterischen Lymphknoten (MLN, *mesenteric lymph nodes*) aber auch in den Peyer'schen Platten (PP) und den isolierten lymphoiden Follikeln (ILFs, *isolated lymphoid follicles*). Der MLN besteht aus einem äußeren Cortex (Rinde) und einer inneren Medulla (Mark). Im äußeren Cortex befinden sich B-Zellfollikel. Die tiefer liegenden oder paracorticalen Bereiche bestehen hauptsächlich aus T-Zellen und DCs. Die Medulla setzt sich aus Strängen von Makrophagen und antikörpersezierenden Plasmazellen zusammen. Afferente lymphatische Gewebe leiten die Lymphe aus dem umliegenden intestinalen Gewebe in die MLN, und zusammen mit der Lymphe auch antigenbeladene APCs. Die Lymphe strömt durch die lymphatischen Follikel und paracorticalen Bereiche in den Marksinus und wird dort über die efferenten Gefäße in der Medulla abgeleitet. Naive Lymphozyten gelangen über das Blut durch spezialisierte Bereiche der Venolen mit hohem kubischen Endothel, den HEVs (HEV, *high endothelial venules*), in die MLN. Über die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 migrieren sie unter anderem in den T-Zellbereich und über die efferenten Lymphe verlassen die Lymphozyten die MLN wieder. Bei den Peyer'schen Platten handelt es sich um organisierte lymphatische

Follikel. Diese sind über den gesamten Dünndarm verteilt und stehen in direktem Kontakt mit der Epithelzellschicht. Sie sind ähnlich wie Lymphknoten aus DCs, Makrophagen, B-Zellfollikeln und T-Zellzonen, aufgebaut. Sie bestehen größtenteils aus B-Zellen, die einen großen Follikel mit Keimzentrum bilden. Zwischen den Follikeln befindet sich die T-Zellzone. Die Besonderheit der PP ist, dass sie direkt unterhalb spezialisierter Epithelzellen, der sogenannten M-Zellen, liegen, welche bei der Aufnahme von Antigenen aus dem Darmlumen eine wichtige Rolle spielen (Kapitel 1.1.3 „Antigenaufnahme – immunologische Überwachung des luminalen Inhalts“). Im Gegensatz zu den PP im Dünndarm sind die ILFs über den gesamten Darm verteilt. Interessanterweise erhöht sich ihre Zahl während einer chronischen Entzündung (reviewed in Izcue *et al.*, 2006 und Izcue *et al.*, 2009).

Bei der Induktion von Immunantworten im Darm spielen vor allem DCs eine entscheidende Rolle, da sie die Zellpopulation darstellen, die luminale Antigene in die T-Zellzonen der MLN und PP transportieren, um dort naiven T-Zellen die aufgenommenen Antigene zu präsentieren (Bimczok *et al.*, 2005; Salazar-Gonzalez *et al.*, 2006; Macpherson *et al.*, 2005). Der efferente Teil des GALT ist aus der Lamina propria, dem Epithelium und den darin liegenden verschiedenen spezialisierten Zellpopulationen des Immunsystems zusammengesetzt. Nach der Stimulation von Lymphozyten im induktiven Teil des GALT verlassen oder passieren diese die MLN und erreichen über den Ductus thoracicus den Blutkreislauf. Über die Expression von darmspezifischen Adhäsionsmolekülen, wie beispielsweise der Integrine $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CD103 sowie CCR9, gelangen die aktivierten Lymphozyten zurück in die Lamina propria und das Epithel, wo sie als diffus verteilte Lamina propria Lymphozyten (LPL) und intraepitheliale Lymphozyten (IEL) gemeinsam mit den ebenfalls vorhandenen Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, Mastzellen, Neutrophilen, DCs, NKT Zellen und eosinophilen Granulozyten) ihre spezifischen pro-inflammatorischen oder supprimierenden Effektorfunktionen ausüben (Kohne *et al.*, 1996, Briskin *et al.*, 1993; Johansson-Lindbom *et al.*, 2005; Annacker *et al.*, 2005). Die LPL und IEL sind durch eine dünne Membran zwischen Epithelium und Lamina propria räumlich voneinander getrennt und unterscheiden sich in ihren funktionellen und phänotypischen Eigenschaften von den peripheren Blutlymphozyten (PBL, *peripheral blood lymphocytes*). Über die MLN, in die die afferenten Lymphgefäße der PP und Lamina propria und die efferenten Lymphgefäße münden, sind somit der induktive und efferente Teil des GALT miteinander verbunden.

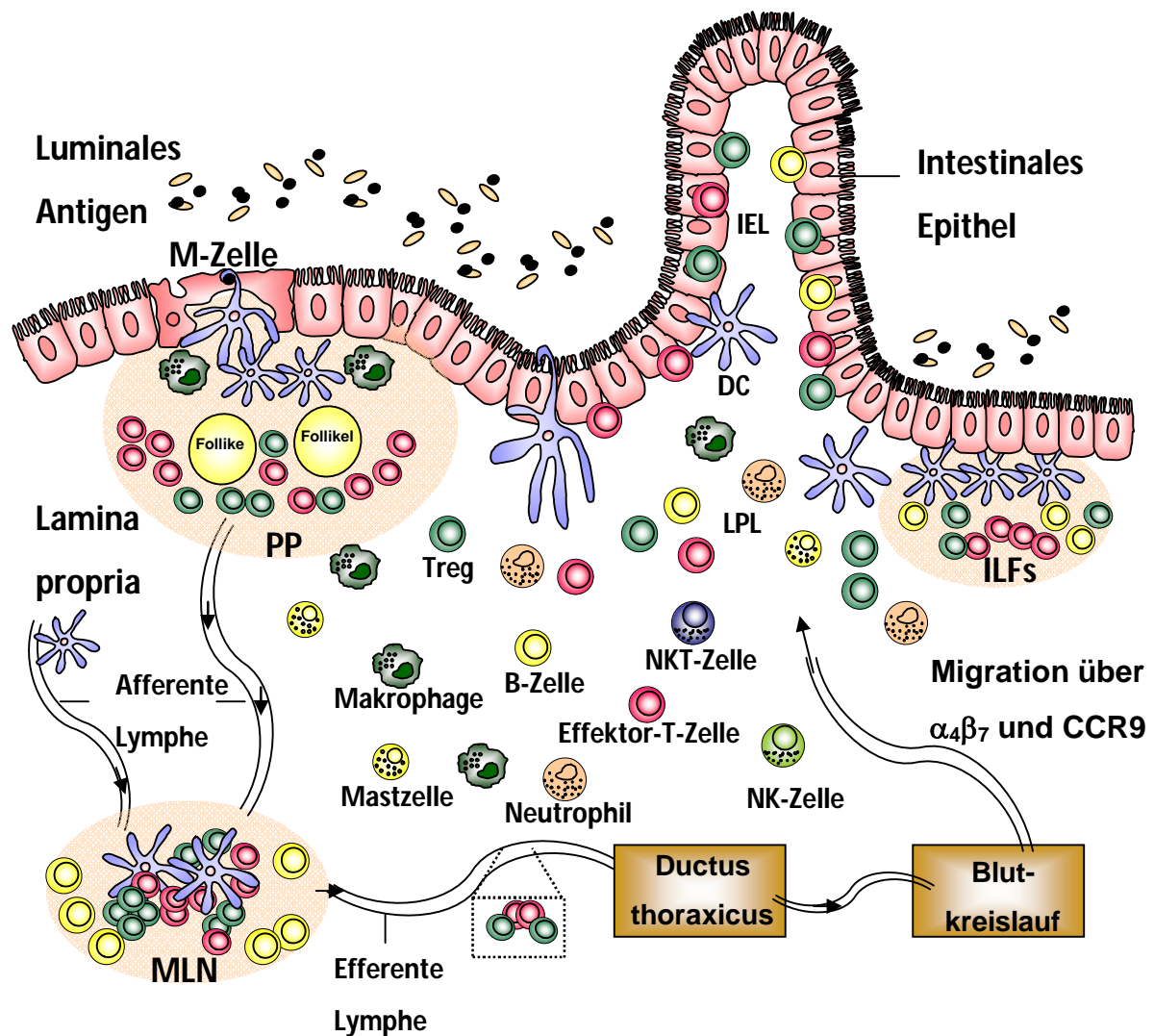


Abb. 1-1: Das Darm-assoziierte lymphoide Gewebe (GALT). Der induktive Teil des GALT besteht vorwiegend aus den mesenterischen Lymphknoten (MLN), den Peyer'schen Platten (PP) und den „isolated lymphoid follicle“ (ILFs). In diesem Bereich des GALT erfolgt die Induktion einer Immunantwort oder Toleranz. Der efferente Teil des GALT ist aus der Lamina propria (LP) und dem intestinalen Epithel zusammengesetzt. Die afferenten Lymphgefäße der PP und LP münden in den MLN. Zur Induktion einer Immunantwort werden luminal Antigene über spezialisierte M-Zellen oder von spezialisierten DCs direkt aus dem Lumen aufgenommen. Aktivierte Lymphozyten gelangen über die efferente Lymphe der MLN in den Blutkreislauf und kehren über die Expression von darmspezifischen Migrationsmolekülen zurück in die LP und das Epithel, wo sie als Lamina propria Lymphozyten (LPL) und intraepitheliale Lymphozyten (IEL) mit den Zellen des angeborenen Immunsystems ihre spezifischen pro- oder anti-inflammatorischen Effektorfunktionen ausüben.

1.1.3 Antigenaufnahme – immunologische Überwachung des luminalen Inhalts

Die Epithelschicht bildet eine klare Abgrenzung zwischen dem luminalen Darminhalt und dem GALT. Um den Darminhalt kontinuierlich immunologisch zu überwachen,

haben sich verschiedene Mechanismen zur Antigenaufnahme aus dem Lumen entwickelt. Ein Großteil der luminalen Antigene wird über den Transport durch M-Zellen erkannt. M-Zellen (Mikrofaltenzellen) sind spezialisierte Epithelzellen, die zwischen den adsorptiven Epithelzellen des Darms liegen und entsprechend ihrer Bezeichnung Mikrofalten statt der sonst üblichen Mikrovilli aufweisen. Luminale Moleküle werden von M-Zellen über Endo- oder Phagozytose aufgenommen und mittels Transzytose durch die M-Zellen hindurch zu den DCs und Lymphozyten in den induktiven PP transportiert. Im terminalen Bereich des Dünndarms können Antigene auch außerhalb der PP und ILFs direkt aus dem Darmlumen über eine spezialisierte DC Population der Lamina propria aufgenommen werden, indem diese DCs verlängerte Dendriten ausbilden, die die Epithelzellschicht penetrieren (Abb. 1-1). Dabei bleibt die epitheliale Barriere durch die Expression von *tight junction* Proteinen aufrechterhalten (Rescigno *et al.*, 2001). Diese Prozesse erlauben die Aufnahme von nicht-invasiven Mikroorganismen. Luminale Antigene können auch durch DCs aufgenommen werden, die sich in der Lamina propria (Chirido *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2000), in Form von lymphoiden Aggregaten direkt unterhalb der Epithelzellschicht (Iwasaki *et al.*, 2007) oder als DC Aggregate am unteren Ende der Mikrovilli (Mowat *et al.*, 2003) befinden.

Allerdings ist für die immunologische Überwachung des Darminhalts entscheidend, dass Antigene nicht nur aus dem Lumen aufgenommen, sondern auch naiven T-Zellen präsentiert werden. Dies erfolgt, indem DCs aus der Lamina propria des Dünndarms luminal Antigene sowie apoptotische Epithelzellen zu dem Hauptinduktionsort im Darm, den MLN, transportieren und dort naiven T-Zellen präsentieren (Niess *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1991; Macpherson *et al.*, 2004). Der Transport von luminalem Antigen durch LP DCs zu den MLN ist wichtig für die Induktion von oraler Toleranz sowie dem Schutz vor Pathogenen (Worbs *et al.*, 2006; Johansson-Lindbom *et al.*, 2005; Salazar-Gonzalez *et al.*, 2006).

Neben den intestinalen DCs sind auch IECs zur Antigenaufnahme und Prozessierung fähig. Sowohl für Dünndarm- als auch für Dickdarmepithelzellen konnte gezeigt werden, dass diese in der Lage sind, Modellantigene wie Ovalbumin oder Hemagglutinin aufzunehmen und zu prozessieren (Westendorf *et al.*, 2009; Telega *et al.*, 2000). Es wird vermutet, dass auch Oberflächenmoleküle auf der

apikalen Seite der IEC als mögliche Rezeptoren für luminale Antigene fungieren könnten (Hershberg und Mayer *et al.*, 2000).

1.1.4 T-Zell-vermittelte Immunreaktionen in der intestinalen Mukosa

In den Induktionsorten des GALTs präsentieren reife DCs naiven T-Zellen die verschiedensten Antigene aus dem Darmlumen und der Lamina propria und induzieren eine Immunantwort. Hierzu gehören pathogene Antigene, aber auch ungefährliche Antigene der natürlichen Darmflora, der Nahrung und körpereigener Zellen. Daher ist das Immunsystem des Darms permanent einer Vielzahl von Antigenen ausgesetzt, die mit großer Selektivität als fremde oder körpereigene sowie als potentiell gefährliche und ungefährliche Antigene identifiziert werden müssen. Entsprechend dem Antigen wird entweder eine inflammatorische Immunantwort oder Immuntoleranz induziert. Dies erfolgt, indem naive $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus der DC und dem aktuell vorherrschenden Zytokinprofil, das hauptsächlich von den Zellen des angeborenen Immunsystems bestimmt wird, zu den verschiedenen Subtypen von Effektor- oder regulatorischen Zellen differenzieren (Abb. 1-2). Die aktivierten $CD4^+$ T-Zellen werden aufgrund ihres Zytokinprofils in Effektor T-Helfer-Zellen (T_H1 -, T_H2 - und T_H17 -Zellen) oder in regulatorische T-Zellen ($CD4^+$ Tregs) eingeteilt. Die T-Helfer-Zellen werden als solche bezeichnet, da sie andere Immunzellen wie $CD8^+$ T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen über Zellkontakte oder Zytokine aktivieren und auf diese Weise die Immunantwort gegen das Antigen unterstützen. Aktivierte $CD8^+$ T-Zellen differenzieren überwiegend zu zytotoxischen $CD8^+$ Effektor T-Zellen (CTL, *cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes*), die auf Antigen-exprimierende Zellen zytotoxisch wirken. Auch $CD8^+$ T-Zellen können zu suppressiven T-Zellen ($CD8^+$ T_s) differenzieren (Westendorf *et al.*, 2009).

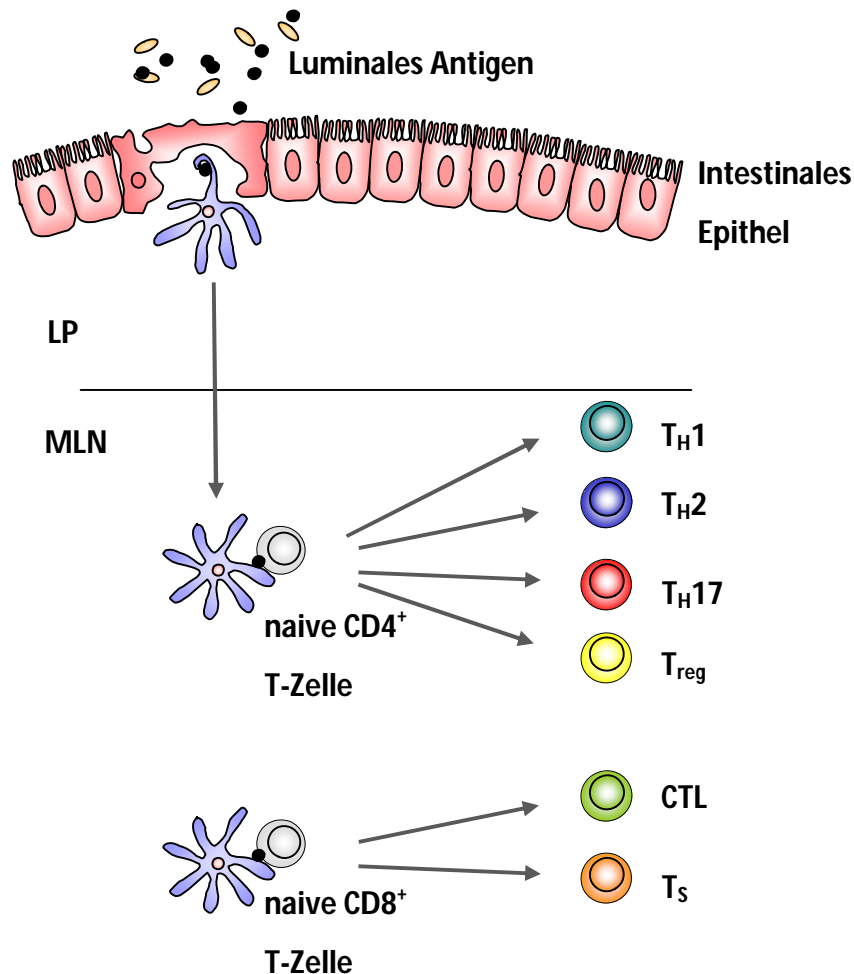


Abb. 1-2: Immunreaktionen in der intestinalen Mukosa. DCs nehmen intestinale Antigene auf und migrieren zur Antigenpräsentation in die MLN. In den MLN werden naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen intestinale Antigene präsentiert. In Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus der DC und dem vorherrschenden Zytokinprofil differenzieren Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen in Effektor T-Helfer-Zellen (T_H1-, T_H2-, und T_H17-Zellen) oder in regulatorische T-Zellen (Tregs) und CD8⁺ T-Zellen in zytotoxische CD8⁺ Effektor T-Zellen (CTL) oder in suppressive T-Zellen (T_s). Modifiziert nach Westendorf et. al., 2009.

1.1.4.1 Inflammatorische T_H1-Immunantwort

Klassische T_H1-Zellen entwickeln sich bei Stimulierung mit Antigenen von intrazellulären Bakterien und Viren über die Aktivierung des für T_H1-Zellen typischen Transkriptionsfaktors T-bet (T-bet, *T-box transcription factor expressed in T cells*). In der intestinalen Mukosa bewirkt die Anwesenheit entzündlicher Mediatoren, wie bakterielle Lipopolysaccharide oder pro-inflammatorischer Zytokine, wie Interferon (IFN)- γ , Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-12, die Aktivierung von DCs,

die wiederum durch die Hochregulation von MHC- und ko-stimulatorischen Molekülen die Ausdifferenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_H1 -Zellen bewirken. T_H1 -Zellen produzieren die pro-inflammatorischen Zytokine $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, IL-2 und IL-12. Diese Zytokine führen einerseits zur Aktivierung von Makrophagen und DCs in der LP und hemmen andererseits die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_H2 - und T_H17 -Zellen sowie in regulatorische T-Zellen. Auf diese Weise kommt es zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und unspezifischer Phagozyten sowie zur Ausschüttung von Histaminen. Die Folge der zytotoxischen Immunantwort ist ein akuter Entzündungszustand, der eine Gewebeerstörung im Darmepithel und die Penetration des Darmepithels durch luminale Antigene bewirken kann. Beispielsweise ist die chronisch-entzündliche Darmerkrankung (CEDE) Morbus Crohn durch eine überschießende T_H1 -Immunantwort gekennzeichnet (Fuss *et al.*, 1996; Matsuoka *et al.*, 2004; Neurath *et al.*, 2002). Zusätzlich zu T_H1 -Zellen wird zunehmend auch T_H17 -Zellen eine große Bedeutung bei dieser Erkrankung zugewiesen. Die meisten Tiermodelle einer Darmerkrankung sind auf eine T_H1 -vermittelte Immunantwort zurückzuführen. Das am besten charakterisierte Modell ist die T_H1 -vermittelte Darmerkrankung in immundefizienten Mäusen, die durch den adoptiven Transfer von naiven $CD4^+CD45RB^{high}$ T-Zellen induziert wird. Interessanterweise sind T_H1 -Zellen auch in Abwesenheit einer Entzündung in der gesunden Mukosa in großer Zahl zu finden, wobei die Ursache ihrer Entstehung noch unklar ist (reviewed in Maynard *et al.*, 2009).

1.1.4.2 Humorale T_H2 -Immunantwort

Im Gegensatz zu T_H1 - und T_H17 -Zellen sind humorale T_H2 -Zellen in Abwesenheit einer Entzündung in der intestinalen Mukosa nicht zu finden. T_H2 -Zellen entwickeln sich hauptsächlich als Antwort auf eine Infektion mit Parasiten. Im humanen Darm ist der Helminth-Wurm der am häufigsten vorkommende Parasit, der die Ausschüttung des Zytokins IL-4 durch Zellen des angeborenen Immunsystems herbeiführt. IL-4 treibt naive T-Zellen in die Differenzierung zu humoralen T_H2 -Zellen (Iwasaki *et al.*, 1999), indem es die Expression des T_H2 -typischen Transkriptionsfaktors GATA3 induziert (Ansel *et al.*, 2006). T_H2 -Zellen unterstützen die Auslösung humoraler B-Zellantworten, indem sie durch die Freisetzung großer Mengen IL-4, IL-5 und IL-13 die Produktion von Antikörpern anregen. Weiterhin werden Mastzellen, Eosinophile und Basophile durch T_H2 -Zellen aktiviert (Mosmann *et al.*, 1986). In der intestinalen

Mukosa wandern aktivierte B-Zellen in die Lamina propia ein, wo sie als Plasmazellen in großen Mengen neutralisierende IgA-Antikörper produzieren (van Ginkel *et al.*, 1999), die zum Schutz der Schleimhautstruktur einen Großteil luminaler Antigene von der Penetration des Darmepithels abhalten (Farstad *et al.*, 2000). Allerdings können auch T_H2-Zellen zur Entwicklung einer Entzündung in der intestinalen Mukosa beitragen. Defekte bei der Herunterregulierung von T_H2-Immunantworten werden im Zusammenhang mit der Ausbildung der chronischen Darmerkrankung Kolitis ulzerosa diskutiert. LPL aus Kolitis ulzerosa Patienten exprimieren vor allem die T_H2-Zytokine IL-13 und IL-5, allerdings kein IL-4 (Fuss *et al.*, 2008; Fuss *et al.*, 2004). Es gibt wenige Tiermodelle, bei denen eine Kolitis ulzerosa-ähnliche Entzündung des Kolons hervorgerufen wird, beispielsweise durch Oxazolone (Boirivant *et al.*, 1998). Ein anderes Beispiel ist die spontan-induzierte T_H2-Zell-vermittelte Kolitis in verschiedenen T-Zell-Rezeptor (TCR, *T cell receptor*)-mutanten transgenen Mäusen, die mittels anti-IL-4 Antikörpern verhindert werden kann (Mombaerts *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1997; Bhan *et al.*, 1999).

1.1.4.3 T_H17-Immunantwort

T_H17-Zellen sind an der Immunabwehr gegenüber vielen verschiedenen Pathogenen, auch extrazelluläre Bakterien und Pilze eingeschlossen, beteiligt (Bettelli *et al.*, 2008). T_H17-Zellen werden durch die Kombination der Zytokine IL-23, IL-6 und TGF- β (TGF- β , *transforming growth factor β*) induziert, die zur Expression des T_H17-typischen Transkriptionsfaktors ROR γ (t) führen (Ivanov *et al.*, 2006; Weaver *et al.*, 2006). Allerdings kann die Differenzierung in einen T_H17-Phänotyp auch in Kooperation mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie ROR α erfolgen (Brustle *et al.*, 2007; Quintana *et al.*, 2008; Schraml *et al.*, 2009; Veldhoen *et al.*, 2008a; Yang *et al.*, 2008b). T_H17-Zellen sezernieren unter anderem IL-17A, IL-17B, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26 und TNF- α und sind in keinem Gewebe so zahlreich vorhanden wie in der LP (Ivanov *et al.*, 2008). Vermutlich steht dies im direkten Zusammenhang mit der großen Menge TGF- β , welches im Darm von IECs, T-Zellen und Zellen des angeborenen Immunsystems produziert wird. Der Anteil T_H17⁺ T-Zellen in der LP des Dünndarms ist in transgenen Mäusen, bei denen die extrazelluläre Aktivierung von TGF- β gestört ist, massiv reduziert (Ivanov *et al.*, 2008). Zusätzlich sind in TGF- β 1-defizienten Mäusen keine T_H17-Zellen zu finden (Mangan *et al.*, 2006). Zahlreiche Studien weisen auf eine pro-inflammatorische Funktion von T_H17-Zellen hin (Nakae

et al., 2003; Kleinschek *et al.*, 2007; Langrish *et al.*, 2005; Shahrara *et al.*, 2008) und die von T_H17-Zellen ausgeschütteten Zytokine spielen eine zentrale Rolle beim Schutz vor mikrobiellen Infektionen (Ivanov *et al.*, 2008). Beispielsweise begünstigen T_H17-Zellen durch die Sekretion von IL-17A und IL-17F die Differenzierung und das Rekrutieren von Neutrophilen in die Lamina propria, und tragen durch die Sekretion von IL-22 zur Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere bei (Zheng *et al.*, 2007). Die Erkenntnis, dass sowohl das T_H1-induzierende Zytokin IL-12 als auch das T_H17-induzierende Zytokin IL-23 aus der gleichen Untereinheit IL-12p40 zusammengesetzt sind, führte zur Untersuchung der Rolle von T_H17-Zellen bei T_H1-vermittelten Darmerkrankungen. Die Studie von Mannon und seinen Kollegen zeigte, dass nicht nur T_H1-Zellen, sondern auch T_H17-Zellen, bei Morbus Crohn eine Rolle spielen. Die Behandlung von Morbus Crohn Patienten mit einem IFN- γ -blockierenden Antikörper wirkte nur begrenzt. Im Gegensatz dazu reduzierte die Verabreichung eines IL-12p40-blockierenden Antikörpers, der sowohl IL-12 als auch IL-23 neutralisierte, die Entzündung effektiv (Mannon *et al.*, 2004). In vielen experimentellen Tiermodellen einer T_H1-vermittelten Darmerkrankung, beispielsweise dem CD4⁺CD45RB^{high} T-Zell-Transfer Modell, konnte die inflammatorische Rolle von T_H17-Zellen bei der Induktion der Darmerkrankung gezeigt werden (Izcue *et al.*, 2008). Aus noch nicht bekannten Gründen befinden sich T_H17-Zellen, wie auch T_H1-Zellen, auch in Abwesenheit einer Entzündung in der gesunden Mukosa (reviewed in Maynard *et al.*, 2009).

1.1.4.4 CD8⁺ Effektor-T-Zell-vermittelte Immunantwort

Aktivierte CD8⁺ T-Zellen differenzieren überwiegend zu CTL, die für die Eliminierung virusinfizierter und entarteter Zellen verantwortlich sind (Russell und Ley *et al.*, 2002). Für die Differenzierung von naiven CD8⁺ T-Zellen in CTL ist neben der Antigenerkennung eine indirekte Stimulation durch T_H1-Zellen notwendig. Nur wenn diese zur gleichen Zeit an die APC binden und eine CD40L/CD40 Interaktion mit der APC erfolgt, kann die APC eine naive CD8⁺ T-Zelle zu einer CTL aktivieren (Schoenberger *et al.*, 1998). CTL wirken auf Zellen, die das Antigen über MHC Klasse I Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen, zytotoxisch. Durch die Sekretion von Perforinen wird die Zellmembran von Zielzellen permeabilisiert. Sezernierte Granzyme dringen durch die von Perforinen gebildeten Öffnungen in die Zielzelle ein und induzieren durch ihre proteolytische Aktivität Apoptose. Durch die Expression von Fas Ligand (CD95L) auf zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen wird ebenfalls Apoptose in

Fas (CD95)-exprimierenden Zellen induziert. Die Rolle von CD4⁺ T-Zellen bei Entzündungen in der intestinalen Mukosa wurde bereits sehr ausführlich untersucht. Dem gegenüber existieren bisher nur wenige Daten über die Rolle von CD8⁺ T-Zellen bei intestinaler Homöostase und Entzündung. Nichtsdestotrotz konnten einige Arbeitsgruppen eine CD8⁺ T-Zell-vermittelte Darmerkrankung in Tiermodellen induzieren, die auf die Erkennung eines darmspezifischen Antigens und der starken Produktion von IFN- γ und TNF- α zurückgeführt werden kann (Westendorf *et al.*, 2006; Nancey *et al.*, 2006; Vezys *et al.*, 2000; Steinhoff *et al.*, 1999).

1.1.4.5 Regulatorische Immunantwort

Der Darm ist der Teil des Körpers, der am meisten Regulation benötigt, damit gegenüber der Vielzahl verschiedener körperfremder Stoffe keine unkontrollierte Immunantwort ausgelöst wird. Nach der erfolgreichen Eliminierung eines Pathogens aus der intestinalen Mukosa ist es wichtig, dass die Immunreaktion wieder herunterreguliert wird. In der gesunden Mukosa werden laufend Immunantworten gegen mukosale Antigene ausgelöst, die durch regulatorische Mechanismen kontrolliert werden. Diese Mechanismen sind sehr vielfältig, und sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem sind bei der Regulation involviert. Ein Fehler bei der Kontrolle von Immunantworten führt zum Verlust von Toleranz und stellt einen Teil der Pathologie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen dar. Es gibt verschiedene Populationen regulatorischer Zellen, die sich hinsichtlich ihres Phänotyps und Zytokinprofils unterscheiden. Hierzu zählen neben Subpopulationen der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und DCs vor allem Tregs (reviewed in Honda *et al.*, 2009; Izcue *et al.*, 2009; Sakaguchi *et al.*, 2008; Lan *et al.*, 2007; Saurer *et al.*, 2009; Boden und Snapper *et al.*, 2008; Maloy *et al.*, 2003). In Kapitel 1.2 „Regulatorische T-Zellen“ werden die verschiedenen Treg-Populationen sowie ihre Entstehung, Suppressionsmechanismen und Bedeutung für die intestinale Homöostase ausführlich beschrieben.

1.1.5 Mechanismen zur Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase

Der Darm ist wie keine andere Körperoberfläche einer Unzahl verschiedener Stoffe ausgesetzt, die entweder ignoriert, toleriert oder elimiert werden müssen. Gegenüber körpereigenen Molekülen sollte prinzipiell keine Immunreaktion stattfinden. Daher

werden auto-reaktive T-Zellen, deren TCR eine hohe Affinität gegenüber einem körpereigenen Molekül zeigt, zum Schutz des Körpers vor Autoimmunreaktionen, bereits im Thymus bei der sogenannten negativen Selektion eliminiert. Dies erfolgt, indem bei auto-reaktiven T-Zellen Apoptose oder der Übergang in einen anergen Zustand induziert wird. Die negative Selektion wird als zentrale Toleranz bezeichnet (reviewed in Palmer *et al.*, 2003). Da allerdings viele körpereigene Antigene nicht im Thymus exprimiert werden und somit auto-reaktive T-Zellen der negativen Selektion entkommen, haben sich verschiedene Mechanismen der peripheren Toleranz entwickelt. Diese schließen die Beteiligung von Tregs aber auch weiterer Zelltypen wie APCs, NK- und natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen) ein (reviewed in Ohashi *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2002; Zitvogel *et al.*, 2002).

Neben der zentralen und peripheren Toleranz, die die Grundlage für die Homöostase des gesamten Organismus sind, haben sich speziell im Darm verschiedenste Mechanismen entwickelt, die für die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase essentiell sind. Interessanterweise finden auch bei intestinaler Homöostase permanent schwache Immunreaktionen gegenüber intestinalen Antigenen statt, die durch verschiedene Regulationsmechanismen kontrolliert werden. Der permanente Kontakt mit intestinalen Antigenen der Darmflora ist sogar wichtig für die Entwicklung eines stabilen, reaktionsfähigen Immunsystems, da Studien an keimfreien Tieren zeigen, dass die Abwesenheit der natürlichen Darmflora zu einer Unterentwicklung des GALT, der Milz und anderer lymphoider Gewebe führt (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). In der intestinalen Mukosa herrscht ein sensibles Gleichgewicht zwischen Entzündung und Toleranz, das durch regulatorische Mechanismen des mukosalen Immunsystems aufrechterhalten wird. Hierzu zählen neben der intestinalen Epithelzellschicht als physikalische Barriere und den bereits beschriebenen unspezifischen Abwehrmechanismen (Kapitel 1.1.1 „Barrieren und unspezifische Abwehrmechanismen“) die Produktion anti-inflammatorischer Moleküle wie TGF- β , IL-10, Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO), IL-35 und thymisches stromales Lymphopoietin (TSLP) durch IECs und verschiedene Zellen des Immunsystems, die zu einem tolerogenen Milieu im Darm beitragen. Das tolerogene Milieu fördert die Erzeugung von Tregs und tolerogenen APCs und unterdrückt die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-23 und IL-12.

Vor allem TGF- β , das in großen Mengen in der intestinalen Mukosa vorliegt, ist essentiell für die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase, da es einerseits auf verschiedene Immunzellen suppressierend wirkt (Kapitel 1.2.5 „Suppressionsmechanismen von Tregs“) und andererseits zur Induktion von Tregs (Kapitel 1.2.4 „Induktion von Tregs in der intestinalen Mukosa“) beiträgt. Obwohl die Konzentration von TGF- β in der intestinalen Mukosa sehr hoch ist, liegt der Großteil in einer inaktiven Form vor. Die Aktivierung von TGF- β erfolgt überwiegend durch α_v -Integrine, die von IECs und DCs produziert werden (Lacy-Hulbert *et al.*, 2007; Travis *et al.*, 2007). Wenn nicht ausreichend aktives TGF- β in der intestinalen Mukosa vorliegt, ist die Entwicklung einer spontanen Kolitis die Folge (Travis *et al.*, 2007).

IL-10 ist wie TGF- β entscheidend für die intestinale Homöostase, was anhand der Entwicklung einer Kolitis in IL-10- oder IL-10-Rezeptor β -defizienten Mäusen ersichtlich ist. Es spielt eine zentrale Rolle bei der Herunterregulierung von entzündlichen Immunreaktionen. Vor allem für Tregs ist IL-10 essentiell zur Aufrechterhaltung der Foxp3 Expression und ihres suppressiven Potentials in der entzündeten intestinalen Mukosa (Murai *et al.*, 2009). Allerdings sind die präzisen Mechanismen, durch die IL-10 eine Kolitis verhindert, noch nicht vollständig bekannt.IDO spielt eine wichtige Rolle bei der intestinalen Homöostase, da es die Aminosäure Tryptophan, die für die T-Zell-Proliferation essentiell ist, degradiert (Mellor *et al.*, 2004).IDO wird auch im gesunden Darm sehr stark exprimiert. Allerdings wird die Expression bei einer Entzündung verstärkt, um die Immunreaktion einzudämmen (Gurtner *et al.*, 2003; Harrington *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2007). Die Blockierung von IDO durch einen Inhibitor oder Gen-Knockout zu einer verstärkten antibakteriellen Immunantwort (Harrington *et al.*, 2008) und einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber der Entwicklung einer Kolitis bei *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) (Jasperson *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse verdeutlichen die anti-inflammatorische Wirkung von IDO.

Kürzlich wurde auch in der intestinalen Mukosa das neue inhibitorische Zytokin IL-35 entdeckt, das selektiv von Foxp3⁺ Tregs exprimiert wird und anscheinend regulatorische Aktivität vermittelt. IL-35 Defizienz beeinträchtigt das suppressive Potential von Tregs, wohingegen exogen zugeführtes IL-35 die Proliferation von T-Zellen suppressiert. Darüber hinaus verlieh die retrovirale Transfektion von Effektor T-

Zellen mit IL-35 diesen Zellen regulatorische Aktivität (Collison *et al.*, 2007; Collison *et al.*, 2007).

Das Zytokin TSLP wird von IECs konstitutiv produziert. TSLP trägt dazu bei, dass mukosale DCs zu tolerogenen DCs moduliert werden, die IL-10 und kein IL-12 produzieren (Rimoldi *et al.*, 2005). Tolerogene DCs sind besonders wichtig für die Aufrechterhaltung von immunologischer Toleranz gegenüber nicht-pathogenen und körpereigenen Antigenen. Sie haben einen niedrigen Aktivierungszustand, der durch eine geringe Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen gekennzeichnet ist. Dadurch verfügen sie nicht über die Fähigkeit naive T-Zellen ausreichend zu stimulieren. Erhält eine naive T-Zelle bei der Stimulierung mit Antigen kein ko-stimulatorisches Signal, geht diese T-Zelle in einen permanent anergen Zustand über und kann im Normalfall nicht wieder reaktiviert werden. Dadurch wird diesem Antigen gegenüber eine immunologische Reaktionsunfähigkeit hervorgerufen. Weiterhin zeigen tolerogene DCs eine eingeschränkte Reaktivität gegenüber bakteriellen Antigenen, den TLR (TLR, *toll like receptors*)-Liganden, und besitzen die Fähigkeit durch die Sekretion von IL-10, TGF- β , Retinsäure (RA, *retinoic acid*) oderIDO regulatorische T-Zellen zu induzieren (Kapitel 1.2.4 „Induktion von Tregs in der intestinalen Mukosa“) oder die Aktivierung von Effektorzellen zu inhibieren (reviewed in Westendorf *et al.*, 2009). Von besonderer Bedeutung für die Aufrechterhaltung peripherer und oraler Toleranz ist eine Subpopulation von CCR7⁺ DCs, die konstitutiv apoptotische IECs endozytieren und zu den T-Zell-Zonen der MLN transportieren, wodurch vermutlich eine periphere Toleranz gegenüber dem entsprechenden Antigen induziert wird (Huang *et al.*, 2000; Worbs *et al.*, 2006).

Zusätzlich zu tolerogenen DCs tragen auch IECs zur Homöostase in der intestinalen Mukosa bei. In Ko-Kultur-Experimenten konnte die regulatorische Funktion von IECs anhand der verstärkten Expansion von antigen-spezifischen Tregs (Westendorf *et al.*, 2009) und der Induktion von tolerogenen DCs (Iliev *et al.*, 2009) gezeigt werden. Aber auch Makrophagen der Lamina propria sind aufgrund der geringeren Expression von TLRs und CD14 gegenüber bakteriellen Antigenen hyporeaktiv (Smythies *et al.*, 2005).

Für den Schutz vor einer überschießenden unkontrollierten Immunreaktion in der intestinalen Mukosa, die zur Zerstörung des Darmepithels führen kann, ist die rechtzeitige Beendigung einer Immunreaktion notwendig. Hierbei trägt die Apoptose

von Effektorzellen zur Entstehung eines immunsuppressiven Milieus bei, da einerseits apoptotische Zellen TGF- β freisetzen (Chen *et al.*, 2001) und andererseits die Phagozytose von apoptotischen Lymphozyten die TGF- β Produktion in DCs und Makrophagen fördert (Perruche *et al.*, 2008).

All diese Ergebnisse verdeutlichen das komplexe Zusammenspiel zwischen verschiedenen Zelltypen zur Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase (Abb. 1-3). Eine fehlerhafte Regulation des mukosalen Immunsystems sowie ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Faktoren können zu Toleranzverlust und dadurch zu Allergien oder Autoimmunerkrankungen führen.

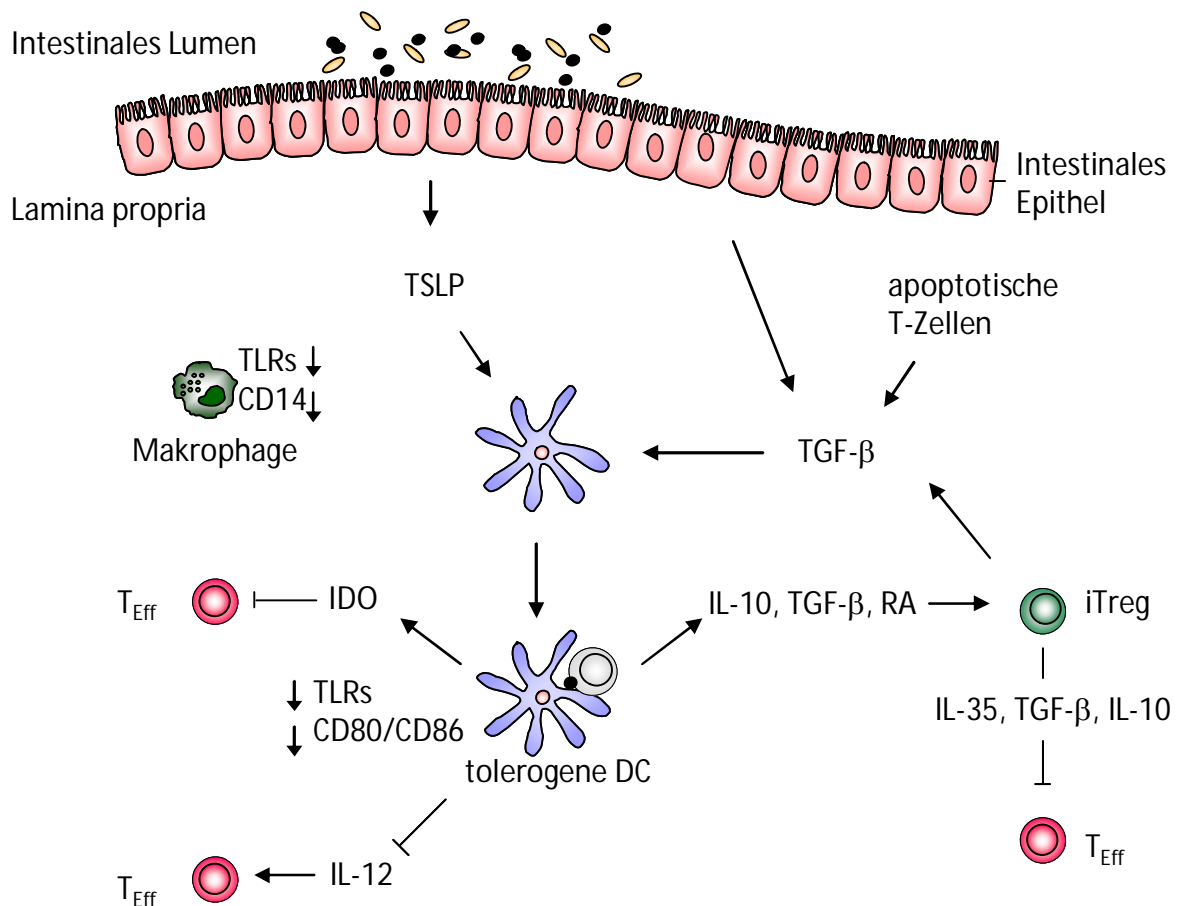


Abb. 1-3: Mechanismen zur Aufrechterhaltung eines tolerogenen Milieus in der intestinalen Mukosa. Die Produktion anti-inflammatorischer Moleküle wie TGF- β , IL-10, IDO und TSLP durch Epithelzellen und verschiedene Zellen des Immunsystems tragen zu einem tolerogenen Milieu in der intestinalen Mukosa bei und fördern die Differenzierung von induzierten Tregs (iTregs) und tolerogenen APCs.

1.2 Regulatorische T-Zellen

In der gesunden Mukosa werden laufend Immunantworten gegen mukosale bakterielle Antigene ausgelöst, die durch Tregs kontrolliert werden müssen. Wenn die Regulation des mukosalen Immunsystems gestört wird, können Toleranzverlust, Allergien und Autoimmunität die Folge sein. Daher ist es nicht überraschend, dass vor allem im Darm eine Vielzahl verschiedener Tregpopulationen vorhanden ist, die sich in ihrem Phänotyp und ihrer Funktionsweise unterscheiden. Diese können in $CD4^+$ und $CD8^+$ Tregs unterschieden werden (Saurer und Müller *et al.*, 2009). Sowohl die Population der $CD4^+$ als auch der $CD8^+$ Tregs kann basierend auf den Ort ihrer Entstehung in Thymus-gereifte natürliche Tregs (nTregs) und in der Peripherie induzierte Tregs (iTregs) unterteilt werden. Allerdings ist der Großteil der Treg-Forschung auf $CD4^+$ Tregs bezogen. Wenn im Folgenden von nTregs gesprochen wird, ist in dieser Arbeit die Population der thymus-gereiften $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs gemeint.

1.2.1 Natürliche $CD4^+$ Tregs

Die Population der nTregs ist für die periphere Toleranz essentiell, da sie zur Suppression auto-reaktiver T-Zellen, die der negativen Selektion im Thymus entkommen sind, beitragen. Wie bereits in Kapitel 1.1.5 „Mechanismen zur Aufrechterhaltung intestinaler Homöostase“ beschrieben, werden auto-reaktive T-Zellen, die körpereigene Antigene mit einer hohen Affinität binden, bei der negativen Selektion im Thymus eliminiert. Im Gegensatz dazu differenzieren T-Zellen, die im Thymus eine niedrige Affinität gegenüber körpereigenen Antigenen aufweisen, zu einem regulatorischem Phänotyp (Shevach *et al.*, 2001). Daher ist das TCR Repertoire von nTregs spezifisch für körpereigene Antigene (Hsieh *et al.*, 2004). Die Population der nTregs umfasst ca. 5-10 % der peripheren $CD4^+$ T-Zellen und ist durch die starke konstitutive Expression von CD25, der α -Kette des IL-2 Rezeptors, und die Ko-Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 (*forkhead box protein P3*) charakterisiert. Foxp3 ist für die Entwicklung und Funktion von nTregs essentiell (Sakaguchi *et al.*, 2005; Hori *et al.*, 2003).

Die enorme Bedeutung von Foxp3^+ Tregs für die Aufrechterhaltung von Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen und intestinaler Homöostase wird vor allem bei Patienten mit dem IPEX-Syndrom (Immundysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked Syndrom) deutlich. Bei dem IPEX-Syndrom handelt es sich um eine schwere multiorganische, vor allem den Gastrointestinaltrakt betreffende, letale Autoimmunerkrankung, die durch Mutationen im *foxp3* Gen hervorgerufen wird (Bennett *et al.*, 2001; Ziegler *et al.*, 2006). Auch in dem natürlichen Tiermodell des IPEX-Syndroms, der *scurfy*-Maus, führt das Fehlen des intakten Foxp3 zur Entwicklung einer letalen Autoimmunerkrankung (Brunkow *et al.*, 2001; Fontenot *et al.*, 2003).

1.2.2 Natürliche CD8^+ Tregs

Sowohl im Maus- als auch im Humansystem kommen thymus-gereifte $\text{CD8}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ Tregs vor, deren Phänotyp dem von CD4^+ nTregs ähnelt, (Bienvenu *et al.*, 2005; Cosmi *et al.*, 2003; Xystrakis *et al.*, 2004; Fontenot *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu den natürlichen $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ Tregs gibt es innerhalb der CD8^+ T-Zellen noch weitere Subpopulationen natürlicher CD8^+ Tregs. Hierzu zählen $\text{CD8}^+\text{CD122}^{\text{high}}\text{Foxp3}^+\text{IL-10}^+\text{IFN-}\gamma^+$ Tregs (Rifa'i *et al.*, 2004; Endharti *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008), $\text{CD8}^+\text{CD28}^-$ Tregs (Menager-Marcq *et al.*, 2006; Najafian *et al.*, 2003), $\text{CD8}^+\text{CD45RC}^{\text{low}}\text{Foxp3}^+$ Tregs (Xystrakis *et al.*, 2004), Qa-1 restringierte $\text{CD8}\alpha\alpha^+$ Tregs (Jiang *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2004) und intestinale $\text{CD8}\alpha\alpha^+$ Tregs (Poussier *et al.*, 2002; Saurer *et al.*, 2004). Qa-1 (Maus) und HLA-E (Human) sind nicht-klassische MHC-Klasse-Ib Moleküle, die auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen und APCs exprimiert werden (Kumar *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2006). Da Qa-1 bzw. HLA-E (Humanes Leukozyten Antigen E) ausschließlich auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, sind Qa-1 bzw. HLA-E restringierte CD8^+ Tregs vor allem zum Schutz vor immunpathologischen Schäden durch exzessive T-Zell-Aktivierung wichtig, indem sie aktivierte T-Zellen durch Zytolyse eliminieren (Hu *et al.*, 2004).

Insgesamt sind CD8^+ Tregs genauso essentiell wie CD4^+ Tregs für die Regulation des Immunsystems zur Eindämmung und Überwindung inflammatorischer Prozesse, wie sie beispielsweise bei CEDE und Multiple Sklerosis vorkommen (reviewed in Lu und Cantor *et al.*, 2008; Correale *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 1988; Brimnes *et al.*, 2005; Tennakoon *et al.*, 2006). Auf die physiologische Rolle von intestinalen $\text{CD8}\alpha\alpha$ und

CD8⁺CD28⁻ Tregs wird in Kapitel 1.2.6 „Bedeutung von Tregs zur Aufrechterhaltung intestinaler Homöostase“ näher eingegangen.

1.2.3 Induzierte Tregs (iTregs)

Neben den thymus-gereiften nTregs existieren weitere T-Zellpopulationen mit regulatorischem Potential, die in der Peripherie aus naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auf unterschiedlichste Art und Weise *in vitro* und *in vivo* induziert werden können (Khattar *et al.*, 2009; Shevach *et al.*, 2006). Faktoren, die die Induktion von Tregs beeinflussen, sind: Zytokine, Wege der Antigenaufnahme (intravenös, subkutan, oral, rektal), Stärke des Stimulus, APCs und gewebespezifische Faktoren. Beispielsweise fördern unreife DCs, die den endozytotischen Rezeptor DEC205 exprimieren, die Induktion von antigen-spezifischen CD4⁺ Tregs (Kretschmer *et al.*, 2005; Bruder *et al.*, 2005). Weiterhin ist gezeigt, dass Tumorzellen die Induktion von CD4⁺ Tregs begünstigen (Schatton *et al.*, 2010). Die kontinuierliche Antigenstimulation in Anwesenheit von CD14⁺ Monozyten kann humane CD8⁺CD25⁻ T-Zellen zu CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs konvertieren (Mahic *et al.*, 2008). Darüber hinaus werden Tregs bei der Infektion mit pathogenen Mikroorganismen und Viren induziert (reviewed in Belkaid *et al.*, 2008 und Belkaid *et al.*, 2007). Interessanterweise werden Tregs auch bei einer Entzündung parallel mit Effektorzellen in Anwesenheit von anti-inflammatorischen Zytokinen induziert (Workman *et al.*, 2009; Hansen *et al.*, 2006). Diese Hypothese wird auch durch Ergebnisse von Billerbeck unterstützt, der die parallele Expansion von humanen virus-spezifischen Foxp3⁻ Effektor und de novo generierten Foxp3⁺CD8⁺ Tregs zeigen konnte (Billerbeck *et al.*, 2007). Der Großteil der iTregs wird vermutlich im Darm generiert.

1.2.4 Induktion von Tregs in der intestinalen Mukosa

Die intestinale Mukosa, die einer Vielzahl unterschiedlicher Antigene ausgesetzt ist und in der pro- und anti-inflammatorische Immunreaktionen in einem hochsensiblen Gleichgewicht zueinander stehen, ist ein Ort, der besonders intensive Regulierung benötigt. Daher ist es nicht überraschend, dass das GALT einen prädestinierten Ort für die Induktion von Tregs darstellt. Dies konnte auch von Sun und Kollegen experimentell bestätigt werden. Diese zeigen, dass nach der systemischen

Verabreichung naiver polyklonaler T-Zellen Tregs hauptsächlich in der LP des Dünndarms und den MLN zu finden sind (Sun *et al.*, 2007).

Ein weiterer Hinweis für den Darm als prädestinierter Ort zur Induktion von CD4⁺ und CD8⁺ Tregs ist die sogenannte orale Toleranz. Hierbei wird gegenüber Antigenen, die intranasal oder oral verabreicht werden, eine immunologische Toleranz erworben, die durch die Induktion antigen-spezifischer Tregs in der Lamina propria und den MLN erfolgt (Chen *et al.*, 1994; Faria *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 1991; Mucida *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007). Weiterhin ist die Population der CD8⁺ T-Zellen, die statt des konventionellen $\alpha\beta$ TCR einen $\gamma\delta$ TCR exprimieren, eine Subpopulation innerhalb der Lymphozyten im intestinalen Epithel, die vermutlich auch eine wichtige Rolle bei der Induktion oraler Toleranz spielt. Durch den Transfer von $\gamma\delta$ T-Zellen aus zuvor mit Antigen gefütterten Mäusen in unbehandelte Mäuse kann Toleranz gegenüber diesem Antigen erzeugt werden. Die Depletion der $\gamma\delta$ T-Zellen führt dagegen zum Verlust oraler Toleranz (Ke *et al.*, 1997; Kapp *et al.*, 1997).

Darüber hinaus können Westendorf und ihre Kollegen in zwei doppeltransgenen Mausmodellen zeigen, dass die chronische Präsentation von Antigen im Darm zur Induktion von antigen-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ Tregs führt. Bei diesen Modellen handelt es sich um die VILLIN-HA/TCR-HA und VILLIN-HA/CL4-TCR doppeltransgenen Mäuse. In der VILLIN-HA transgenen Maus wird das Modellantigen Hemagglutinin (HA) unter Kontrolle des Enterozyten-spezifischen VILLIN-Promotors ausschließlich von Epithelzellen im Darm exprimiert (Westendorf *et al.*, 2005). Die Kreuzung VILLIN-HA transgener Mäuse mit Mäusen, die einen transgenen HA-spezifischen T-Zell-Rezeptor auf CD4⁺ T-Zellen (TCR-HA) oder CD8⁺ T-Zellen (CL4-TCR) exprimieren, führt in den Nachkommen zur Induktion von HA-spezifischen Tregs. Diese HA-spezifischen CD4⁺Foxp3⁺ und CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen sind hauptsächlich in dem darm-assoziierten Gewebe wie den MLN, nicht aber im Thymus zu finden (Abb. 1-4). Dies deutet auf die Induktion der Tregs im GALT hin (Westendorf *et al.*, 2006; Westendorf *et al.*, 2009; Westendorf *et al.*, 2006).

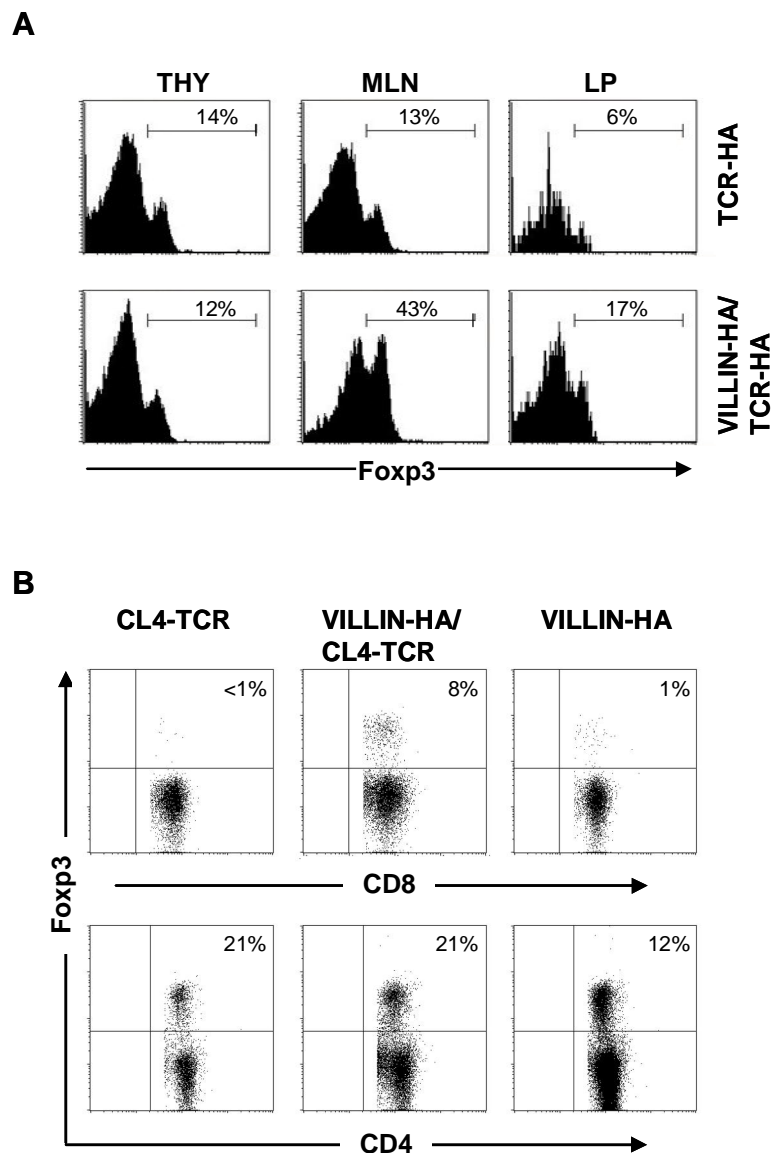


Abb. 1-4: Chronische Antigenpräsentation im Darm führt zur Induktion von antigen-spezifischen $CD4^+Foxp3^+$ und $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen. (A) Prozentualer Anteil $Foxp3^+$ T-Zellen innerhalb der HA-spezifischen $CD4^+$ T-Zellpopulation aus dem Thymus (Thy), den mesenterischen Lymphknoten (MLN) und der Lamina propria (LP) von TCR-HA und VILLIN-HA/TCR-HA (aus Westendorf *et al.*, 2009). (B) Prozentualer Anteil von $Foxp3^+$ T-Zellen innerhalb der $CD8^+$ oder $CD4^+$ T-Zellpopulation aus den MLN von CL4-TCR, VILLIN-HA/CL4-TCR und VILLIN-HA transgenen Mäusen (aus Westendorf *et al.*, 2006).

Bei der Suche nach den entscheidenden Faktoren, die den Darm zum Induktionsort für Tregs prädestiniert, wurde die tolerogene Rolle von immunmodulatorischen Zytokinen wie TGF- β , IL-10 und IL-35, die in großen Mengen in der intestinalen Mukosa vorliegen, sowie darmspezifischen DCs und Makrophagen näher untersucht.

Ebenso wie bei der Suppression von Zielzellen und der Aufrechterhaltung intestinaler Homöostase, spielt TGF- β eine wichtige Rolle bei der peripheren Induktion von Tregs. Verschiedene Gruppen zeigen, dass TGF- β sowohl *in vitro* als auch *in vivo* naive CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu Foxp3⁺ iTregs konvertieren kann (Chen *et al.*, 2003; Cobbold *et al.*, 2004; Kretschmer *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2005). Allerdings verlieren TGF- β induzierte Tregs im Gegensatz zu nTregs sowohl die Expression von Foxp3 als auch ihr regulatorisches Potential in Abwesenheit von TGF- β (Floess *et al.*, 2007). Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Stabilität der Foxp3 Expression und dem Methylierungsmuster von Cytosin-Guanin (CpG)-Motiven im *foxp3* Promotor. Die stabile Expression von Foxp3 in nTregs korreliert mit der vollständigen Demethylierung von CpG-Motiven in der untersuchten Region des *foxp3* Promotors. Im Gegensatz dazu sind diese CpG-Motive bei TGF- β -induzierten CD4⁺ Tregs trotz der starken Foxp3 Expression unvollständig demethyliert (Floess *et al.*, 2007). Die TGF- β -vermittelte Induktion eines regulatorischen Phänotyps im Zusammenhang mit der Expression von Foxp3 konnte auch für CD8⁺ T-Zellen sowohl im Human- als auch im Maussystem gezeigt werden (Siegmund *et al.*, 2009; Kapp *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2008).

Bei der Untersuchung der tolerogenen Rolle von darmspezifischen DCs konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass DCs aus darm-assoziierten lymphoiden Geweben wie den MLN, PP und der LP im Gegensatz zu DCs aus der Milz die Fähigkeit besitzen, naive CD4⁺ T-Zellen in Foxp3⁺ iTregs zu konvertieren (Sun *et al.*, 2007; Coombes *et al.*, 2007). Die nähere Charakterisierung dieser DCs zeigte, dass ihr Potential zur Induktion von Tregs mit der Expression des α_E -Integrins CD103 und der Sekretion von aktivem TGF- β im Zusammenhang steht (Coombes *et al.*, 2007). CD103 wird hauptsächlich von DCs aus mukosalen Geweben wie den MLN und der Lamina propria exprimiert. Interessanterweise induzieren diese CD103⁺ DCs die Expression der darmspezifischen Migrationsmoleküle CCR9 und $\alpha_4\beta_7$ auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Sun *et al.*, 2007; Annacker *et al.*, 2005; Johansson-Lindbom *et al.*, 2005). Dies steht in Verbindung mit der Produktion von RA, einem Vitamin A Metabolit, durch CD103⁺ DCs. Darüber hinaus besteht ein Zusammenhang zwischen RA und der TGF- β -vermittelten Induktion von Tregs. Die Inhibierung der RA-Synthese vermindert die TGF- β -abhängige Induktion von iTregs, wohingegen zusätzliche RA den Konvertierungsprozess drastisch verstärkt (Mucida *et al.*, 2007).

Darüber hinaus induziert RA die Expression von CCR9 und $\alpha_4\beta_7$ auf Lymphozyten und begünstigt somit die Migration von induzierten Tregs in den Darm (Benson *et al.*, 2007; Iwata *et al.*, 2004). Weitere Studien zeigen, dass murine und humane naive T-Zellen unabhängig von der Herkunft der DC oder APC in Anwesenheit von TGF- β und RA zu Foxp3⁺ T-Zellen konvertiert werden können. Allerdings ist RA ohne die Anwesenheit von TGF- β nicht in der Lage Tregs zu induzieren (Sun *et al.*, 2007; Mucida *et al.*, 2007). Auch für das Humansystem ist gezeigt, dass die Aktivierung naiver CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in Anwesenheit von TGF- β /RA zur Induktion von CD4⁺Foxp3⁺ Tregs führt und dass die Expansion von nTregs in Anwesenheit von TGF- β /RA deren suppressives Potential verstärkt (Wang *et al.*, 2009).

Neben tolerogenen DCs aus der Lamina propria und MLN konnte auch bei Makrophagen aus der Lamina propria im Gegensatz zu Makrophagen aus der Milz das Potential zur Induktion von Tregs festgestellt werden. Bei diesem Prozess nutzen die LP Makrophagen im Darm vorliegendes TGF- β in Synergie mit dem selbst produzierten IL-10 und RA um naive CD4⁺ T-Zellen zu iTregs zu konvertieren (Denning *et al.*, 2007).

Das immunsuppressive Treg-induzierende Milieu im Darm erfährt durch Tregs, die überwiegend im Darm zu finden sind, wiederum einen positiven *feedback loop* zur Induktion von iTregs. Einerseits können Tregs DCs zu tolerogenen DCs modulieren, die wiederum weitere iTregs generieren (Min *et al.*, 2003), und andererseits besitzen Tregs aber auch die Fähigkeit naive T-Zellen in einem TGF- β und IL-10-abhängigen Prozess zu iTregs zu konvertieren. Dieser Prozess zur Induktion von iTreg wird als *infectious tolerance* bezeichnet (Cobbold *et al.*, 1998; Cobbold *et al.*, 2004; Dieckmann *et al.*, 2002; Jonuleit *et al.*, 2002).

Diese Vielfalt an verschiedenen Mechanismen zur Induktion von Tregs im Darm zeigt, dass das intestinale Immunsystem eigene selbstbeherrschende Strategien entwickelt hat, um die Induktion von Tregs zu begünstigen. Daher tragen diese iTregs zusammen mit den in die intestinale Mukosa eingewanderten natürlichen Tregs zur enormen Verstärkung der intestinalen Homöostase bei.

1.2.5 Suppressionsmechanismen von Tregs

Der genaue Mechanismus, wie Tregs ihre suppressive Funktion gegenüber anderen Immunzellen ausüben, ist noch nicht vollständig bekannt. Es wird postuliert, dass Tregs über mehrere, parallel ablaufende Mechanismen, die sich gegenseitig unterstützend beeinflussen, protektiv wirken. Die Mechanismen, wie CD8⁺ Tregs ihre suppressive Aktivität ausüben, sind mit denen von CD4⁺ Tregs vergleichbar. Diese Suppressionsmechanismen können entsprechend der Wirkungsweise in 4 Gruppen unterteilt werden (Abb. 1-5): Sekretion inhibitorischer Zytokine, Zytolyse der Zielzelle, Störung des Stoffwechsels der Zielzelle und Modulation des Reifestatus und der Funktion von DCs (Workman *et al.*, 2009).

Inhibitorische Zytokine wie TGF- β , IL-10 und IL-35 hemmen die Proliferation von Effektor T-Zellen. TGF- β wirkt über unterschiedliche Mechanismen auf verschiedene Immunzellen suppressierend. Es hemmt die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen dadurch, dass es die Produktion des Wachstumsfaktors IL-2 inhibiert und Zell-Zyklus Inhibitoren hochreguliert (Gorelik *et al.*, 2002). Darüber hinaus blockiert TGF- β die Differenzierung von naiven T-Zellen in T_H1- oder T_H2-Zellen, indem es die Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA-3 runterreguliert und somit die Expression von IFN- γ und IL-4 erniedrigt wird (Gorelik *et al.*, 2002; Heath *et al.*, 2000). Weiterhin wirkt TGF- β auf die Aktivierung von Makrophagen suppressierend und inhibiert deren Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen. Auch auf DCs hat TGF- β einen inhibitorischen Einfluss, indem es die Expression von MHC-Klasse-II Molekülen auf DCs verringert und deren antigen-präsentierende Fähigkeit reduziert (Gorelik *et al.*, 2002).

Ebenso wie TGF- β , wirkt auch IL-10 auf die Differenzierung und Proliferation verschiedener Immunzellen wie T-Zellen, APCs, B-Zellen und Granulozyten inhibierend. Dadurch verhindert IL-10 sowohl die Präsentation von Antigenen als auch die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine (reviewed in Asadullah *et al.*, 2003).

Bei Zell-Zell-Kontaktabhängiger Suppression agieren Tregs vermutlich durch die Granzym- und / oder Perforin-vermittelte Apoptose der Zielzelle. Obwohl dies eigentlich ein typischer Mechanismus von zytotoxischen CD8⁺ T- und NKT-Zellen ist, kann die Expression von Granzym A in humanen und Granzym B in murinen Tregs detektiert werden. Die Granzym-abhängige Zytolyse von Zielzellen durch Tregs wird

sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Modellen gezeigt. Die Abhängigkeit von Perforin ist bei diesem Prozess noch ungeklärt (Gondek *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2004; Correale *et al.*, 2008).

Die Störung des Metabolismus der Zielzelle ist ebenfalls ein postulierter Suppressionsmechanismus von Tregs. Eine Hypothese ist, dass Tregs durch die massive Expression von CD25 lokales IL-2 in großen Mengen binden. IL-2 ist ein Wachstumsfaktor, der für die Proliferation von Effektorzellen essentiell ist. Durch die Bindung von IL-2 durch Tregs wird IL-2 den Effektorzellen entzogen und deren Proliferation unterdrückt (Thornton *et al.*, 1998; Vignali *et al.*, 2008). Ein weiterer Mechanismus ist der Transport von anti-proliferativ wirkendem zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) über *gap junctions* in die Zielzelle (Bopp *et al.*, 2007). Zusätzlich ist die Adenosin-Rezeptor 2A (A2AR)-vermittelte Immunsuppression beschrieben. Hierbei generieren Tregs über die Oberflächenmoleküle CD39 und CD73 perizelluläres Adenosin, das von Effektorzellen über A2AR gebunden wird. Durch diese Bindung wird die Sekretion des pro-inflammatorischen und die Treg-Differenzierung inhibierenden IL-6 in den Effektorzellen verhindert (Kobie *et al.*, 2006; Deaglio *et al.*, 2007).

Darüber hinaus wirken Tregs auch indirekt supprimierend, indem sie den Aktivierungsstatus und die Funktion von DCs beeinflussen. Tregs reduzieren die Fähigkeit von DCs, naive T-Zellen zu aktivieren, indem sie ko-stimulatorische und MHC-Klasse II Moleküle auf DCs binden und diese Bindungsstellen für naive T-Zellen blockieren. Beispielsweise werden die ko-stimulatorischen Moleküle CD80/CD86 über CTLA-4 und MHC-Klasse-II Moleküle über LAG3 blockiert (Vignali *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2008; Sojka *et al.*, 2008). Zusätzlich wird vermutet, dass Tregs die Produktion vonIDO in DCs fördern und somit indirekt die Proliferation von Effektorzellen inhibieren (Mellor *et al.*, 2004).

Ein weiterer Suppressionsmechanismus, der allerdings bisher nur für CD8⁺CD25⁺LAG3⁺Foxp3⁺ Tregs beschrieben wurde, ist die Sekretion des immunsuppressiven CCL4, das die Aktivierung von T-Zellen durch Störung der T-Zell-Rezeptor Signalkaskade inhibiert (Joosten *et al.*, 2007).

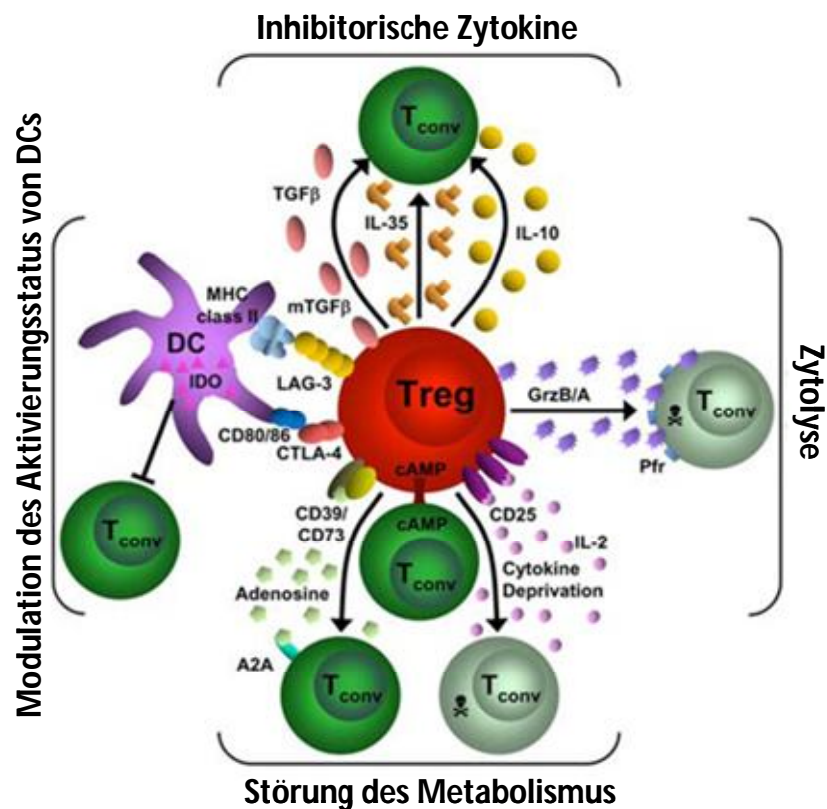


Abb. 1-5: Verschiedene Modelle Treg-vermittelter Suppression. Die inhibitorischen Zytokine TGF-β, IL-35 und IL-10 hemmen die Proliferation von Effektor T-Zellen. Tregs induzieren Granzym B (GrzB/A)- und Perforin (Pfr)-vermittelte Apoptose in Effektor T-Zellen. Tregs stören den Metabolismus von Effektor T-Zellen durch die Bindung von IL-2 an CD25, Einbringen von cAMP über die Bildung von „gap junctions“ oder durch die CD39/CD73-vermittelte Generierung von immunsuppressivem Adenosin. Tregs wirken indirekt supprimierend durch Modulation des Aktivierungsstatus von DCs. Modifiziert nach Workman *et al.*, 2009.

Die Vielzahl dieser unterschiedlichen Suppressionsmechanismen von Tregs verdeutlicht ihre unerlässliche Rolle für die Aufrechterhaltung peripherer Toleranz, da sie in Abhängigkeit von der jeweiligen Situation *in vivo* die Fähigkeit besitzen verschiedene Zelltypen zu supprimieren. Entsprechend ihres immunsuppressiven Potentials gelten derzeit die Moleküle CD25, CTLA-4, GITR, CD127, LAG3, Nrp1, Gpr83, CD83 und vor allem Foxp3 als Markermoleküle von Tregs. Allerdings kann keines dieser Gene (außer Foxp3 bei murinen T-Zellen) als hochspezifischer Marker für Tregs bezeichnet werden, da diese meist auch in aktivierten T-Zellen exprimiert werden.

1.2.6 Bedeutung von Tregs zur Aufrechterhaltung intestinaler Homöostase

Eines der ersten Tiermodelle, das die wichtige immunsuppressive Bedeutung von nTregs für die intestinale Homöostase darstellt, ist das T-Zell-vermittelte Kolitis-Modell. Bei diesem Modell führt der Transfer von naiven $CD4^+CD45RB^{high}$ T-Zellen in immundefiziente Mäuse, in denen sich keine Lymphozyten entwickeln, zu einer T_H1 -vermittelten Kolitis. Interessanterweise kann die Entwicklung der Kolitis durch den Ko-Transfer von $CD4^+CD45RB^{low}$ T-Zellen verhindert werden (Powrie *et al.*, 1993; Morrissey *et al.*, 1993). Die genauere Charakterisierung von $CD4^+CD45RB^{low}$ T-Zellen zeigt, dass die regulatorische Kapazität von $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T-Zellen, einer Subpopulation innerhalb von $CD4^+CD45RB^{low}$ T-Zellen, ausgeübt wird. Der Transfer von $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T-Zellen kann nicht nur die Initiierung von Kolitis verhindern, sondern auch bereits etablierte Kolitis heilen (Uhlir *et al.*, 2006; Mottet *et al.*, 2003).

Bemerkenswert sind auch Studien, die zeigen, dass nTregs offenbar nicht nur gegenüber körpereigenen Antigenen wirken, sondern sich auch exogenen Darmantigenen anpassen. Vor allem die Darmflora scheint einen fördernden Einfluss auf Tregs auszuüben, da Tregs aus keimfreien Mäusen wesentlich schlechtere Suppressoren sind als Tregs aus Mäusen mit einer spezifisch pathogenfreien Darmflora (Singh *et al.*, 2001). Weiterhin wird in verschiedenen Tiermodellen die essentielle Rolle von $CD4^+$ Tregs bei oraler Toleranz (Zhang *et al.*, 2001) und zur Inhibierung von T_H1 -Immunantworten gegenüber Bakterien der natürlichen Darmflora (Gad *et al.*, 2003) gezeigt.

Ein Zusammenhang zwischen dem Anteil von Tregs und der Aktivität einer intestinalen Entzündung kann auch im Humansystem gezeigt werden. Patienten, die an Morbus Crohn oder Kolitis ulzerosa leiden, zeigen während der aktiven Phase der Erkrankung einen reduzierten Anteil an $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ Tregs im peripheren Blut, wohingegen dieser Anteil während der Remission erhöht ist. Im Gegensatz zur Reduzierung des Treg-Anteils im peripheren Blut ist der Anteil an Tregs in der entzündeten Mukosa gegenüber nicht-entzündeten Bereichen erhöht. Diese Ergebnisse deuten auf eine Migration von Tregs aus dem peripheren Blut in die entzündete Mukosa hin, um dort Entzündungsreaktionen zu reduzieren (Maul *et al.*, 2005).

Die wichtige Rolle von CD8⁺ Tregs bei der Kontrolle von Immunreaktionen in der intestinalen Mukosa wird daran deutlich, dass der Ko-Transfer von CD8 $\alpha\alpha$ TCR $\alpha\beta$ IEL erfolgreich die Entstehung von CD4⁺CD45RB^{high} T-Zell-vermittelter Kolitis in immundefizienten Mäusen verhindert (Poussier *et al.*, 2002). Diese intestinalen CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ Tregs bleiben sogar nach starker antigen-spezifischer Stimulierung *in vivo* nicht-zytotoxisch und exprimieren weiterhin das immunmodulatorische Zytokin TGF- β (Saurer *et al.*, 2004). Eine weitere Population CD8⁺ Tregs, die zur intestinalen Homöostase beiträgt, besteht aus CD8⁺CD28⁻ T-Zellen der Milz oder darm-assoziierten Geweben wie dem intestinalen Epithel und der Lamina propria. Diese können ebenfalls, im Gegensatz zu CD8⁺CD28⁺ T-Zellen, CD4⁺CD45RB^{high} T-Zell-vermittelte Kolitis in immundefizienten Mäusen durch die Expression von IL-10 und TGF- β verhindern (Menager-Marcq *et al.*, 2006). Allez und seine Kollegen zeigen, dass zwischen IECs und CD8⁺ Tregs zur Aufrechterhaltung von intestinaler Homöostase ein enger Zusammenhang besteht. Die Stimulierung von T-Zellen aus dem peripheren Blut mit intestinalen Epithelzellen führt zur Proliferation von suppressiv aktiven CD8⁺CD28⁻CD101⁺CD103⁺ Tregs (Allez *et al.*, 2002). Besonders nennenswert ist, dass CD8⁺ T-Zellen aus der Lamina propria von gesunden Spendern im Gegensatz zu CD8⁺ T-Zellen aus der Lamina propria von CEDE Patienten suppressive Aktivität zeigen (Brimnes *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit von CD8⁺ Tregs zur Aufrechterhaltung intestinaler Homöostase beim Menschen. Eine weitere CD8⁺ Tregpopulation zur Behandlung intestinaler Entzündungen sind CD8⁺CD44⁻CD103^{high} T-Zellen, die im Ko-Transfer mit TNF- α überexprimierenden CD4⁺ T-Zellen die Entwicklung von Ileitis in immundefizienten Mäusen verhindern (Ho *et al.*, 2008). Interessanterweise werden supprimierende CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen auch in Darmkrebsgewebe detektiert. Dies lässt auf eine Beteiligung dieser Zellen an der Tumor-induzierten Suppression des Immunsystems schließen (Chaput *et al.*, 2009).

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit von Tregs zur Kontrolle von Immunreaktionen gegenüber körpereigenen Antigenen sowie ungefährlichen Antigenen der Nahrung und natürlichen Darmflora zur Aufrechterhaltung intestinaler Homöostase.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Intestinale Homöostase wird durch das hochsensible Gleichgewicht zwischen entzündlichen und tolerogenen Immunreaktionen aufrechterhalten. Eine viel diskutierte Ursache für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen der intestinalen Mukosa ist eine unkontrollierte T-Zell-Antwort gegen Darmantigene. Die Entwicklung gezielter Ansätze zur therapeutischen Modulation von T-Zell-Antworten erfordert ein umfassendes Verständnis über die komplexe Organisation des intestinalen Immunsystems. Daher ist das Ziel dieser Arbeit, die Mechanismen der Induktion und Regulation von T-Zell-Antworten in der intestinalen Mukosa zu charakterisieren.

In diesem Zusammenhang wird im ersten Teil dieser Arbeit untersucht, in welchen mukosalen Kompartimenten die Aktivierung von CD8⁺ Effektor T-Zellen stattfindet. Dabei werden CD8⁺ T-Zell-vermittelte Immunantworten in den Mesenterischen Lymphknoten, den Peyer'schen Platten und der Lamina propria charakterisiert. Zusätzlich wird analysiert, welche Zellen an der Präsentation von intestinalen Antigenen und der daraus resultierenden T-Zell-Aktivierung beteiligt sind.

Bei der Regulation und Eindämmung von Immunantworten in der intestinalen Mukosa sind Tregs von entscheidender Bedeutung. Defizite bei der Funktionalität von Tregs oder ihrem numerischen Anteil führen zum Verlust von Toleranz und stellen einen Teil der Pathologie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen dar. Während bereits verschiedene CD4⁺ Treg-Populationen zur Kontrolle intestinaler Entzündungen ausführlich beschrieben wurden, sind die Induktion und der Phänotyp von CD8⁺ immunsuppressiven T-Zellen in der intestinalen Mukosa wenig erforscht. Im zweiten Teil dieser Arbeit werden Mechanismen zur Induktion von CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen in der intestinalen Mukosa untersucht und funktionell charakterisiert. Darüber hinaus wird untersucht, ob es bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu einer Veränderung innerhalb der CD8⁺ T-Zellpopulation kommt.

MATERIAL UND METHODEN

2 Material und Methoden

2.1 Mauslinien

Alle verwendeten Mauslinien sind auf dem genetischen BALB/c Hintergrund und heterozygot oder homozygot für das jeweilige Transgen. Die verwendeten Tiere wurden in der Tierexperimentellen Einheit des UK Essen unter SPF-Bedingungen in IVC2-Käfigen (IVC = individuell ventilierte Käfige) gehalten. Zum Ausschluss mikrobieller Kontaminationen wurden alle drei Monate Sentinel-Mäuse einer histologischen, serologischen und parasitologischen Gesundheitsüberprüfung durch ein externes Labor unterzogen.

BALB/c

BALB/c Mäuse wurden aus den Laboratorien von Harlan Winkelmann GmbH (Borchen) bezogen.

VILLIN-HA

Transgene VILLIN-HA Mäuse exprimieren das Hemagglutinin des Influenza-Virus A/PR/8/34 unter Kontrolle des Enterozyten-spezifischen VILLIN-Promotors (Westendorf *et al.*, 2005)

CL4-TCR

In transgenen CL4-TCR Mäusen entwickeln etwa 90 % der CD8⁺ T-Zellen einen transgenen α/β -TCR ($V\alpha 10$ und $V\beta 8.2$), der das Peptid HA 512-520 des Influenza-Virus A/PR/8/34 auf einem MHC-Klasse-I-Molekül H-2K^d (H-2K^d:HA₅₁₂₋₅₂₀) spezifisch erkennt (Morgan *et al.*, 1996).

Foxp3/GFP

Bei Foxp3/GFP transgenen Mäusen wird eGFP (GFP = *green fluorescence protein*) unter Kontrolle des Foxp3 Promotors exprimiert (Haribhai *et al.* 2007). Diese Mäuse stammen aus dem Jackson Laboratory (USA) und wurden in der Tierexperimentellen Einheit des UK Essen in homozygoter Form weiter gezüchtet.

CL4-TCR/Foxp3/GFP

CL4-TCR/Foxp3/GFP doppeltransgene Mäuse wurden in der Tierexperimentellen Einheit des UK Essen für das Transgen Foxp3/GFP in homozygoter Form gezüchtet.

2.2 Patienten

Von PD Dr. med. Jost Langhorst (Kliniken Essen-Mitte) wurden Blutproben von 13 Patienten (6 männlich, 7 weiblich; im Alter von 31-71 Jahre) mit aktiver Kolitis ulzerosa zur Verfügung gestellt. Blutproben von 18 gesunden Spendern (8 männlich, 8 weiblich; im Alter von 22-87 Jahre) dienten als Kontrollgruppe.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Detektion transgener Mäuse

Zur Identifizierung VILLIN-HA- und CL4-TCR- transgener Mäuse wurden PCR-Amplifikationen mit genomischer DNA aus Schwanzbiopsien durchgeführt. In Tab. 2-1 sind die verwendeten Transgen-spezifischen Primerpaare aufgelistet.

Tab. 2-1: Oligonukleotidprimerpaare zur Detektion transgener Mäuse

Transgen	Primer	Annealing-Temperatur (T _A)
VILLIN-HA	5'-GCCTTAAGCCGGCTGTGATAGCA-3' 5'-CTGGAAGCAGTGGGTCGCATTCT-3'	55.6 °C
CL4-TCR	5'-GCAGGGCTGAAAGAACAGCAA-3' 5'-GCTTCCTCCAGAATTTGAGGC-3'	58 °C
Foxp3/GFP	5'-GCGTAAGCAGGGCAATAGAGG-3' 5'-GCATGAGGTCAAGGGTGATG-3'	58 °C

Der Standardreaktionsansatz für die PCR-Reaktion besteht aus:

x ng	genomische DNA
1x	Reaktionspuffer (Promega, Mannheim)
1.5 mM	MgCl ₂ (Promega, Mannheim)
1 mM	dNTP Mix (1 mM jedes Nukleotid) (Fermentas, St. Leon-Rot)
5 µM	Vorwärtsprimer (MWG Biotech, Ebersberg)
5 µM	Rückwärtsprimer (MWG Biotech, Ebersberg)
0.5 U	GoTaq Hot Start Polymerase (Promega, Mannheim)
ad 20 µl	H ₂ O steril

Anschließend wurden die PCR-Amplifikationen mit dem in Tab. 2-2 angegebenen Programm im Thermocycler (T3 Biometra, Göttingen) durchgeführt

Tab. 2-2: PCR-Programm bei der Detektion transgener Mäuse.

		10 Zyklen			27 Zyklen		
Temperatur °C	95.0	95.0	T _A	72.0	95.0	T _A	72.0
Zeit (Min:Sekunden)	10:00	0:30	1:30	1:30	0:15	0:45	1:30

2.3.2 Expressionsanalysen mittels quantitativer Real-Time RT-PCR

Zur Analyse der Expression von Granzym B in TGF- β /RA-behandelten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ und CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen wurde mRNA unter Anwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) isoliert und in cDNA transkribiert. Für die Reverse Transkription der generierten RNA-Proben in cDNA wurden maximal 5 μ g RNA mittels Reverse Transkriptase und eines Primer-Mixes aus OligodT- und Random Hexamer Primern in komplementäre cDNA-Stränge umgeschrieben. Der Reaktionsansatz für die Reverse Transkription besteht aus:

0.1 - 5 μ g RNA
 0,25 μ g OligodT-Primer (Invitrogen, Karlsruhe)
 1,5 μ g Random Hexamer Primer (Invitrogen, Karlsruhe)
 ad 14 μ l H₂O

Für die Primer-Anlagerung wurden die Proben im Thermocycler (T3 Biometra, Göttingen) zunächst für 10 min auf 70 °C erhitzt und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Für die Reverse Transkription wurden folgende Reagenzien zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben:

1x 5xErststrang-Puffer (Promega, Mannheim)
 2.5 mM dNTP-Mix (2.5 mM jedes Nukleotid) (Fermentas, St. Leon-Rot)
 200 U M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus Point Mutant
 (Promega, Mannheim)

Die Einzelstrangsynthese erfolgte im Thermocycler bei einer Temperatur von 42 °C für 1 h. Durch die anschließende Inkubation für 5 min bei 90 °C wurde eine weitere enzymatische Reaktion unterbunden. Nach Beendigung der Reversen Transkription

wurde zu jeder Probe bis zu 40 µl TE-Puffer hinzugegeben. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA

Anschließend wurde mit der cDNA eine PCR-Amplifikation bezüglich der Expression von GzmB und des Haushaltsgens RPS9 durchgeführt. Die gleichzeitige Analyse mit RPS9 diente der Normalisierung der Messergebnisse auf eine Standardtemplate-Menge. Die verwendeten Primerpaare und das PCR-Programm für die Amplifikation von GzmB und RPS9 sind in Tab. 2-3 und Tab. 2-4 aufgelistet.

Tab. 2-3: Oligonukleotidprimerpaare zur quantitativen Expressionsanalyse von RPS9 und GzmB.

Gen	Primer	Annealing-Temperatur (T _A)
RPS9	5'-CTGGACGAGGGCAAGATGAAGC-3' 5'-TGACGTTGGCGGATGAGCACA-3'	52 °C - 58 °C
GzmB	5'-CCAATGGGCAAATACTCAAACACG-3' 5'-ACACAAGCGGGCCTCCAGAATC-3'	56 °C

Der Reaktionsansatz für die semiquantitative PCR besteht aus:

~40 ng	cDNA-Template
1x	Reaktionspuffer (Promega, Mannheim)
1.5 mM	MgCl ₂ (Promega, Mannheim)
1 mM	dNTP Mix (1 mM jedes Nukleotid) (Fermentas, St. Leon-Rot)
5 µM	Vorwärtsprimer (MWG Biotech, Ebersberg)
5 µM	Rückwärtsprimer (MWG Biotech, Ebersberg)
0.5 U	GoTaq Hot Start Polymerase (Promega, Mannheim)
ad 20 µl	H ₂ O steril

Tab. 2-4: Programm der semiquantitativen PCR.

		30 Zyklen			
Temperatur °C	94.0	94.0	T _A	72.0	72.0
Zeit (Min:Sekunden)	10:00	0:45	0:45	1:00	10:00

Auf Basis der semiquantitativen PCR wurde die Expression von GzmB mit der quantitativen Real-Time RT-PCR bestimmt. Die zu analysierenden cDNA Proben

wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green versetzt. Der Reaktionsansatz für die quantitative PCR besteht aus:

~20 ng	cDNA-Template
1x	Power SYBR Green PCR Master Mix
50-900 nM	Vorwärtsprimer (MWG Biotech, Ebersberg)
50-900 nM	Rückwärtsprimer (MWG Biotech, Ebersberg)
ad 20 µl	H ₂ O steril

Die Fluoreszenzsignale während der Amplifikation wurde mit einem 7500 Fast Real-Time PCR System gemessen. Das PCR-Programm der quantitativen RT-PCR ist in Tab. 2-5 angegeben. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden mit der „7500 Fast System Software“ analysiert (Applied Biosystems).

Tab. 2-5: Programm der quantitativen Real-Time PCR.

		40 Zyklen		
Temperatur °C	95.0	95.0	T _A	72.0
Zeit (Minuten:Sekunden)	10:00	0:15	1:00	1:00

2.3.3 Transkriptomanalysen

Die Transkriptomanalysen von durchflusszytometrisch sortierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺- im Vergleich zu CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen wurden auf Genexpressionsarrays (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) durchgeführt (Kooperation mit Dr. Robert Geffers; Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig). Die RNA wurde entsprechend dem Protokoll „*RNeasy animal cells*“ (Qiagen, Hilden) aus den Proben aufgereinigt. Kontaminierende DNA wurde durch Behandlung mit DNAase verdaut. Die Konzentration und Qualität der RNA wurde elektrophoretisch mit Hilfe des Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) ermittelt. Das Umschreiben von RNA in cDNA und das darauffolgende Umschreiben von cDNA in Cy3-markierte cRNA erfolgte entsprechend dem Protokoll des „*Quick Amp Labeling Kit, one-color*“ Kits (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Die Konzentration der cRNA und der Einbau von Cy3 wurde im Nanodrop (PEQLAB, Erlangen) bestimmt. Anschließend wurden von jeder Probe 1.6 µg Cy3-markierter cRNA auf den Genchip „*G4122F whole mouse genom microarray 4 x 44 K 60mer*“ 16 Stunden bei 65°C hybridisiert (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Nach der Hybridisierung und

dem Waschen, erfolgte das Scannen des Genchips auf dem „*DNA Microarray Scanner with SureScan high Resolution*“ gemäß Herstellerangaben (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Die Signalintensitäten wurden mit der „*Feature Extraction Software 10.5*“ unter Berücksichtigung der empfohlenen Einstellungen durch den Hersteller (GE1_105_Dec08, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) analysiert und mit der „*Genespring Software GX10*“ (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) ausgewertet. Die Rohsignalintensitäten wurden normalisiert (Skalierung auf Median aller Proben) und anschließend in den *log dualis* (\log_2) transformiert (Signal Log Intensität). Der Regulationsfaktor wurde wie unten angegeben berechnet. Die Daten der Transkriptomanalyse sind dieser Arbeit in Form einer CD beigelegt.

$$\text{Regulationsfaktor} = 2^{\frac{\text{Signalintensität normalisiert von GFP}^+}{2} - \frac{\text{Signalintensität normalisiert von GFP}^-}{2}}$$

2.3.4 DNA-Methylierungsstudie im *foxp3* Genlocus

Die durchflusszytometrisch-sortierten Zellen für die DNA-Methylierungsanalyse einer ausgewählten Region des *foxp3* Genlocus wurden zentrifugiert und das Zellpellet bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C eingefroren. Die DNA wurde entsprechend dem Protokoll „*DNA-QIA-Amp-Mini*“ Kit (Qiagen, Hilden) aus den Proben aufgereinigt. Anschließend wurde die Konzentration der isolierten DNA spektrometrisch im Nanodrop (PEQLAB, Erlangen) gemessen und erneut bei -20 °C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren. Wesentlicher Bestandteil der Methylierungsanalyse ist eine Bisulfitbehandlung der DNA. 2 µg DNA wurden denaturiert und mit einer Bisulfitlösung für 16-20 Stunden bei 50 °C im Dunkeln inkubiert. Dabei wird unmethyliertes Cytosin zu Uracil desaminiert, während methyliertes Cytosin unverändert bleibt. Die Bisulfit-behandelte DNA wurde entsprechend dem Protokoll des „*DNA clean-up Wizard*“ Kits (Promega, Mannheim) aufgereinigt.

Tab. 2-6: Touchdown-PCR Programm bei der DNA-Methylierungsanalyse zur Amplifikation einer ausgewählten Region des *foxp3* Promotors mit Bisulfit-behandelter DNA. *Die Temperatur wird bei jedem Zyklus um 0.5 °C, d.h schrittweise von 63 °C auf 56 °C, erniedrigt.

		14 Zyklen			35 Zyklen				
Temperatur (°C)	95.0	95.0	63.0*	72.0	95.0	56.0	72.0	72.0	4.0
Zeit (Min:Sekunden)	5:00	0:20	1:00*	1:00	0:20	1:00	1:00	5:00	∞

Anschließend wurde unter Verwendung des angegebenen Primerpaares die fett markierte Region des *foxp3* Promotors mittels der Touchdown-PCR amplifiziert (Tab. 2-6). Die ausgewählte Region des *foxp3* Promotors enthält 6 Cytosin-Guanin-Motive (Abb. 2-1).

Primerpaar der DNA-Methylierungsanalyse:

Primer 1: 5' - TGTAACGACGGCCAGT**AACCTTAAACCCCTCTAACATC** -3'

Primer 2: 5' - CTTGCTTCTGGCACGAG**AGGAAGAGAAGGGGGTAGATA** -3'

Auszug aus der Sequenz des *foxp3* Promotors:

ctaatactcaccaagcatcc**aaccttgggcccctctggcatc**caagaaagacagaat**cg**atagaacttgggtttgcatggttagccag
atgga**cg**tcacctaccacatc**cg**ctagcaccacatcacctacctgggcctatc**cg**gctacaggatagactagccacttct**cg**ga
ac**g**aaacctgtgggtagatt**tatctgcccccttcttct**ccttggtgc**cg**atgaagcccaatgcatc**cg**gc**cg**c

Abb. 2-1: Primerpaar der DNA Methylierungsanalyse mit TAG Sequenz und Auszug aus der Sequenz des *foxp3* Promotors. Die amplifizierte Region des *foxp3* Promotors ist fett dargestellt. Die rote Markierung zeigt die Primerbindungsstellen. Die Cytosin-Guanin-Motive sind rosa markiert.

In der PCR wurde Uracil durch Thymidin ersetzt. Das PCR-Produkt wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und unter Verwendung des „gel extraction“ Kits (Qiagen) aus dem Gel eluiert, aufgereinigt und im Kapillarsequenziergerät ABI 3100 unter Verwendung eines Primers, der an die Tag Sequenz der PCR Primer bindet, sequenziert.

Bei der Sequenzierung der PCR Produkte, die von Bisulfit-behandelter DNA generiert wurden, reflektiert nun ein „C“ (Cytosin) eine Methylierung der genomischen DNA an dieser Stelle, während ein „T“ (Thymidin) die Abwesenheit einer Methylgruppe darstellt. Im Vergleich mit der unbehandelten, ursprünglichen Sequenz werden je nach Methylierung die ursprünglichen CG Dinukleotide entweder als CG (methyliertes Cytosin) oder als TG (unmethyliertes Cytosin) gelesen.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Antikörper und Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellpopulationen entsprechend ihrer biophysikalischen Eigenschaften (Größe, Granularität) und der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle oder intrazellulären Proteinen identifiziert, charakterisiert und quantifiziert werden. Zum Nachweis spezifischer Markermoleküle wurden Fluorophor-markierte monoklonale Antikörper eingesetzt. In Tab. 2-7 sind das Epitop, das Fluorochrom, der Klon sowie der Hersteller der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgelistet. Bei den verwendeten Fluorophoren handelte es sich um Phycoerythrin (PE), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Allophycocyanin (APC), Pacific Blue (PB) und Phycoerythrin-Cy5 (PE-Cy5). Für die Färbung von Oberflächenproteinen wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und für 10 min bei 4 °C im Dunkeln mit Fluorophor-markierten monoklonalen Antikörpern markiert. Für den Nachweis von intrazellulärem Foxp3 und CTLA-4 wurden zunächst die Oberflächenproteine auf den Zellen markiert. Nach einmaligem Waschen in PBS-Puffer wurden Foxp3 und CTLA-4 unter Anwendung des Kits „*Foxp3 Staining Buffer Set*“ (eBioscience) gemäß den Angaben des Herstellers intrazellulär gefärbt. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden an einem FACSCalibur-System mit CellQuest Software oder an einem LSRII mit DIVA Software (BD Bioscience, Heidelberg) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden entweder in „*dot-plots*“ oder in Histogrammen dargestellt. Größen- und Granularitätsparameter wurden linear, die Fluoreszenzintensitäten logarithmisch aufgetragen.

FACS-Puffer:	PBS-Puffer / 2 % (v/v) FCS / 2 mM EDTA (Roth)
PBS-Puffer (pH 7,0):	8 g/l NaCl / 0.2 g/l KCl / 1.44 g/l Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O / 0.2 g/l KH ₂ PO ₄

Tab. 2-7: Verwendete Antikörper und Fluorophorkonjugate.

Epitop (Anti-Maus-)	Fluorophor	Klon	Hersteller
CD3	PE	145-2C11	BD Pharmingen
CD3e	ungekoppelt	145-2C11	BD Pharmingen
CD4	FITC	GK1.5	BD Pharmingen
CD8a	APC	53-6.7	BD Pharmingen
	PB	53-6.7	BD Pharmingen
	FITC	53-6.7	BD Pharmingen
CD11c	APC	HL3	BD Pharmingen
CD25	PE	PC61	BD Pharmingen
CD103	PE	M290	BD Pharmingen
CTLA-4	PE	UC10-4F10-11	BD Pharmingen
Foxp3	PE	FJK-16s	eBioscience
IFN- γ	PE	XMG1.2	BD Pharmingen
IL-10	PE	JES5-16E3	BD Pharmingen

Epitop (Anti-Human-)	Fluorophor	Klon	Hersteller
CD8	APC	RPA-T8	BD Pharmingen
CD8	FITC	RPA-T8	eBioscience
CD25	APC	BC96	eBioscience
CTLA-4	PE-Cy5	BNI3	BD Pharmingen
Foxp3	PE	PCH101	eBioscience

2.4.2 Sortieren von Zellpopulationen mit der Durchflusszytometrie

Um distinkte Zellpopulationen voneinander separieren zu können und sortiert zu erhalten, wurden Zellen mit entsprechenden Antikörpern markiert und am FACS Ariall-Sorter (BD Bioscience, Heidelberg) unter Verwendung von DIVA Software in Medium sortiert.

2.4.3 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen

Zur Durchführung von Experimenten und Analysen mussten Lymphozyten-suspensionen aus verschiedenen Organen von Mäusen hergestellt werden. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zentrifugationsschritte in einer Zellkulturzentrifuge (Multifuge 3SR+, Thermo Scientific, Langenselbold) für 10 min

bei 1200 Upm und 4 °C durchgeführt. Ficoll- und Bicol-Dichtegradienten-Zentrifugationen erfolgten für 30 min bei 1800 Upm und RT. Am Ende der Isolierung wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen FACS-Puffer oder Medium aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellzahl und Diskriminierung von toten Zellen wurden die Zellen mit dem Farbstoff Trypanblau (Invitrogen, Karlsruhe) angefärbt. Die Auszählung erfolgte am Lichtmikroskop in Neubauer-Zähl-Kammern.

IMDM-Komplettmedium:

IMDM mit GlutaMAX™ I und 25 mM HEPES (Invitrogen, Karlsruhe)
10 % hitzeinaktiviertes FCS (*foetales calf serum*, PAA Laboratories, Österreich),
100 µg/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)
100 U/ml Penicillin (Sigma-Aldrich, USA)
50 µg/ml Gentamicin (PAA Laboratories, Österreich)

Milz

Zur Gewinnung von Lymphozyten aus Milzen wurden diese präpariert und mit 10 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer mit einer Kanülenspritze (Ø 0,45 x 12 m, 26G x ½'', Braun Melsungen AG) ausgespült. Die Zellen wurden zentrifugiert, in FACS-Puffer oder Medium resuspendiert und anschließend gezählt.

Erythrozyten-Lysis-Puffer - ACK-Puffer (pH 7,2-7,4): 8.29 g/l NH₄Cl / 1 g/l KHCO₃ / 0.1 mM EDTA (Roth)

MLN

Zur Herstellung von Lymphozytensuspensionen aus den MLN wurden diese nach der Präparation durch ein 100 µm großes Zellsieb mit FACS-Puffer vereinzelt. Die Zellen wurden zentrifugiert, in FACS-Puffer oder Medium resuspendiert und anschließend gezählt.

Peyer'sche Platten

Zur Herstellung von Lymphozytensuspensionen aus den Peyer'schen Platten wurden diese nach der Präparation durch ein 100 µm großes Zellsieb in eine Petrischale mit FACS-Puffer vereinzelt. Die Zellen wurden zentrifugiert, in FACS-Puffer oder Medium resuspendiert und anschließend gezählt.

Lamina propria

Um Immunzellen aus der Lamina propria des Dünndarms zu isolieren wurde der Dünndarm präpariert und der Darminhalt mit PBS-Puffer ausgespült. Fettgewebe und Peyer'sche Platten wurden entfernt und der Darm mit einer Schere longitudinal geöffnet. Zur Entfernung des restlichen luminalen Inhalts und der Epithelzellschicht wurde der Darm in kleine Segmente geschnitten und zweimal für jeweils 10 min in 60 ml PBS / 3 mM EDTA bei 37 °C rührend inkubiert. Zur Inaktivierung von EDTA wurden die Darmstücke zweimal für jeweils 15 min in 15 ml RPMI / 1% FCS / 1 mM EGTA / 1.5 mM MgCl₂ bei 37 °C rührend inkubiert. Anschließend wurden die Darmstücke in 10 ml RPMI / 1% FCS / 1 mM EGTA / 1.5 mM MgCl₂ für 15 sek gevortext und mit PBS gespült. Für den Aufschluss des Gewebes wurden die Darmstücke sehr klein zerschnitten und für 2h in 30 ml RPMI / 20% FCS / 100 U/ml Collagenase von Clostridium histolyticum (Sigma-Aldrich, USA) bei 37°C rührend inkubiert und anschließend durch ein 100 µm großes Zellsieb filtriert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert. Abschließend wurden die Lymphozyten der Lamina propria über einen Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation Schritt (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) aus der Interphase isoliert, zentrifugiert und in FACS-Puffer oder Medium resuspendiert.

PBMC

Heparin-behandeltes Blut wurde um den Faktor 2 mit PBS-Puffer verdünnt. Mononukleäre Zellen wurden über Bicol-Dichtegradienten-Zentrifugation (Biochrom AG, Berlin) aus der Interphase isoliert. Isolierte PBMC wurden mit FACS-Puffer gewaschen, gezählt und entweder sofort weiter analysiert oder in Einfriermedium bei -80 °C aufbewahrt.

Einfriermedium: IMDM Kompletmedium / 10% DMSO (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

2.4.4 Isolierung von CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen

Zur Isolierung von humanen und murinen CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen wurde das autoMACS Separationssystem verwendet (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Das humane und murine „CD8⁺ T Cell Isolation Kit“ und das „CD4⁺ T Cell Isolation Kit“ wurde gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

2.4.5 Isolierung von Dendritischen Zellen

Zur Isolierung von CD11c⁺ DCs aus Milz und MLN wurde das Gewebe in kleine Stücke geschnitten, mit Collagenase / DNase Lösung für 45 min bei 37°C verdaut und durch ein 100 µm großes Zellsieb mechanisch vereinzelt. Die Zellsuspension wurde mit FACS-Puffer gewaschen. CD11c⁺ Zellen wurden unter Anwendung von „CD11c (N418) MicroBeads“ gemäß den Angaben des Herstellers über positive Selektion am autoMACS Separationssystem aus einer Zellsuspension isoliert (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach).

Collagenase / DNase Lösung: FACS-Puffer / 1 mg/mL Collagenase Typ D (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) / 10 µg/mL Deoxyribonuclease (DNase) I Typ II (Sigma-Aldrich, USA)

Zur Isolierung von DCs aus der Lamina propria des Dünndarms wurde der Dünndarm wie in Kapitel 2.6.4 beschrieben präpariert, gewaschen, mit Collagenase-Lösung verdaut und filtriert. Für die Isolierung von DCs wurde die Zellsuspension mit Antikörpern gegen CD11c, B220 und CD3 gefärbt und CD11c⁺ Zellen wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers in Medium sortiert.

2.4.6 Induktion von CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen *in vitro*

Für die Induktion von murinen CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ Zellen, wurden 2x10⁶ CD8⁺CD25⁻ naive T-Zellen aus der Milz von Foxp3/GFP transgenen Mäusen mit 4x10⁵ DCs aus der Milz von BALB/c Mäusen, 0.5 µg/ml murinen anti-CD3 Antikörper, 2 ng/ml humanen rekombinanten TGF-β und 100 nM Retinsäure in einer 12-Loch Platte bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. An Tag 2 wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 mit Medium verdünnt und 1 ng/ml humanes rekombinantes TGF-β (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt), 50 nM Retinsäure (Sigma-Aldrich, USA) sowie 50 U/ml humanes rekombinantes IL-2 (eBioscience) wurden zu der Kultur hinzugegeben. Nach vier Tagen wurde die Foxp3/GFP Expression in den CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Für die Induktion von humanen CD8⁺Foxp3⁺ Zellen, wurden 8x10⁵ CD8⁺ T-Zellen mit 0.5 µg/ml humanen anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern (Miltenyi Biotec), 2 ng/ml

humanen rekombinanten TGF- β und 100 nM Retinsäure in einer 24-Loch Platte bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. An Tag 2 wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 mit Medium verdünnt und 1 ng/ml humanes rekombinantes TGF- β , 50 nM Retinsäure sowie 50 U/ml humanes rekombinantes IL-2 wurden zu der Kultur hinzugegeben. Nach vier Tagen wurde die Foxp3 Expression in den CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

2.4.7 CFSE-Markierung von Lymphozyten

Um die Proliferationsrate von T-Zellen bestimmen zu können, wurden die Zellen mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester (CFSE) markiert. CFSE dringt passiv in das Zellinnere ein und bindet dort irreversibel an Zellproteine. Sobald intrazelluläre Esterasen den Ester hydrolysieren, fängt er an zu fluoreszieren. Die Fluoreszenz hält in ruhenden Zellen über Monate an und ihre Intensität halbiert sich in proliferierenden Zellen bei jeder Teilung. Durch die Abnahme der Fluoreszenzintensität kann die Proliferationsrate bestimmt werden. Da CFSE besonders lichtempfindlich ist, wurden sämtliche Schritte der CFSE Markierung abgedunkelt durchgeführt. Die angereicherten CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen wurden in 4 ml IMDM aufgenommen und mit 2.5 μ mol CFSE für 8 min bei 37°C dunkel inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 4 ml FCS, und ein erneuter Inkubationsschritt (5 min/ 37°C/ dunkel). Abschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer verdünnt, zentrifugiert und in Medium aufgenommen.

CFSE: Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit (Invitrogen, Karlsruhe)

2.4.8 Proliferationstests

Für die Analyse HA-präsentierender DCs wurden 5x10⁴ DCs aus verschiedenen Organen von VILLIN-HA transgenen oder BALB/c Mäusen mit 2.5x10⁵ CFSE-markierten naiven HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus CL4-TCR transgenen Mäusen in 96-Loch-Flachbodenplatten in 200 μ l Medium bei 37 °C im Brutschrank für 5 Tage ko-kultiviert. Die Proliferation von CFSE-markierten CD8⁺ T-Zellen wurde über die Abnahme des CFSE-Farbstoffes im Durchflusszytometer bestimmt.

2.4.9 Inhibitionstest *in vitro*

Zur Untersuchung der *in vitro* suppressiven Aktivität von murinen TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen wurden durchflusszytometrisch-sortierte TGF- β /RA-behandelte CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺- und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁻ T-Zellen mit 1×10^5 CFSE-markierten naiven CD4⁺CD25⁻ Reporter T-Zellen im Verhältnis 1:1 in 96-Loch-Flachbodenplatten in 200 μ l Medium ko-kultiviert und mit 5×10^4 DCs aus der Milz von BALB/c Mäusen und 0.5 μ g/ml anti-CD3 Antikörper stimuliert. Nach drei Tagen wurde die Proliferation der Reporter T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes im Durchflusszytometer gemessen. Für die Untersuchung der Zellkontaktabhängigkeit wurden die CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen von den CFSE-markierten naiven CD4⁺CD25⁻ Reporter T-Zellen und DCs durch eine semipermeable Membran getrennt.

Zur Untersuchung der *in vitro* suppressiven Aktivität von humanen TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen wurden durchflusszytometrisch-sortierte TGF- β /RA-behandelte CD8⁺CD25⁺ T-Zellen mit 5×10^4 CFSE-markierten autologen naiven CD4⁺ Reporter T-Zellen im Verhältnis 1:1 in 96-Loch-Flachbodenplatte in 200 μ l Medium ko-kultiviert und mit dem „*Treg Suppression Inspector*“ (Miltenyi Biotec) stimuliert. Nach sechs Tagen wurde die Proliferation der Reporter T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes im Durchflusszytometer gemessen.

2.4.10 Bestimmung von intrazellulären Zytokinen

Zur Bestimmung von intrazellulären Zytokinen wurden 4×10^5 durchflusszytometrisch-sortierte TGF- β /RA-behandelte CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁻ T-Zellen in 96-Loch-Flachbodenplatten in 200 μ l Medium mit 5 μ g/ml Brefeldin A (Sigma-Aldrich, USA), 10 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich, USA) und 1 μ g/ml Ionomycin (Sigma-Aldrich, USA) für 4 Stunden restimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und Oberflächenmoleküle gefärbt (s. Kapitel 2.5). Für die Färbung von intrazellulären Zytokinen wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd für 15 min bei 4 °C fixiert, mit PBS gewaschen und mit 0.1 % NP40 für 4 min bei 20 °C permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit anti-IFN- γ - oder anti-IL-10- Antikörperlösung für 30 min bei 4 °C im Dunkeln gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.4.11 Bestimmung von sezernierten Zytokinen

Zur Bestimmung sezernierter Zytokine wurden 4×10^5 durchflusszytometrisch-sortierte TGF- β /RA-behandelte CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ und CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen in 96-Loch-Flachbodenplatten in 200 μ l Medium für 20 Stunden mit 10 ng/ml PMA und 1 μ g/ml Ionomycin restimuliert. Anschließend wurden die Überstände entnommen. Die Überstände eines Triplikates wurden vereinigt und bis zur weiteren Analyse bei -70 °C gelagert. Für die Quantifizierung von sezerniertem IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12p40, IL-17, IL-23 und TNF- α wurde das „*Procarta Cytokine Assay Kit*“ (Panomics, Fremont, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Messungen wurden an einem Luminex200 durchgeführt. Die Konzentration der Zytokine wurde mit der Luminex IS Software bestimmt (Luminex Corporation, Austin, USA).

2.5 Tierexperimentelle Methoden

2.5.1 Intravenöse Injektion von T-Zellen

Bis zu 5×10^6 T-Zellen wurden in 100 μ l PBS aufgenommen und mittels einer Einmal-Feindosierungsspritze (0,3x12 mm, B. Braun Petzold GmbH) intravenös (i.v.) in die Schwanzvene von Mäusen injiziert.

2.5.2 Operative Entfernung von mesenterischen Lymphknoten

Für die operative Entfernung von mesenterischen Lymphknoten (MLN) aus VILLIN-HA transgenen Mäusen und nicht-transgenen Geschwistertieren wurden die Tiere mit 75 mg/kg Körpergewicht Ketamin (A. Albrecht GmbH, Aulendorf) und 1 mg/kg Körpergewicht Rompun (Bayer Health Care, Leverkusen) narkotisiert. Die Narkoselösung wurde in PBS angesetzt und i.p. injiziert. Den narkotisierten Tieren wurde mit einem 1 cm langen Bauschnitt die Bauchhöhle geöffnet und der Darm freigelegt. Die Darmschlingen wurden mit sterilem PBS feucht gehalten. Anschließend wurde die Gruppe der MLN entfernt. Anschließend wurden die Darmschlingen in die Bauchhöhle reponiert. Nach dem Eingriff wurde das Peritoneum mit resorbierenden Fäden zugenäht und die Bauchhaut mit Klammern verschlossen. Nach der operativen Resektion der MLN folgte eine zweiwöchige

Regenerationsphase zur Wiederherstellung des Lymphsystems (Kooperation mit Dr. Manuela Ahrendt; Medizinische Hochschule Hannover, Hannover).

2.5.3 Orale Applikation von FTY720

Die entsprechende Menge für 1 mg/kg Körpergewicht FTY720 (Novartis, Schweiz) wurde in 500 µl PBS aufgenommen und oral über eine Knopfkanüle (Durchmesser: 1 mm, Länge: 40 mm; Acufirm, Dreieich) verabreicht.

2.5.4 Kontakthypersensibilitätsmodell

Zur Untersuchung der suppressiven Aktivität von murinen TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen in einem *in vivo* System wurde das Kontakthypersensibilitätsmodell, einem Entzündungsmodell der Haut, verwendet. BALB/c Mäuse wurden an Tag 0 durch das Auftragen einer 0.5 % igen Öl/DNFB-Emulsion auf die rasierte Rückenhaut gegenüber DNFB sensibilisiert. An Tag 5 erfolgte die lokale Reaktivierung DNFB-spezifischer T-Zellen durch das Auftragen von einer 0.3 % igen Öl/DNFB-Emulsion auf das rechte Ohr. 36 Stunden nach Reaktivierung wurde die allergische Reaktion anhand der Stärke der Ohrschwellung unter Verwendung eines „engineer's micrometer“ (Mitutoyo, Japan) bestimmt (Pos. Ktrl.). Um zu untersuchen, ob TGF- β /RA-induzierte CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ Tregs das Potential besitzen, die akute Phase der Entzündungsreaktion zu inhibieren, wurden an Tag 4, 24 Stunden vor der lokalen Reaktivierung am rechten Ohr, sortierte TGF- β /RA-behandelte CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ oder CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁻ T-Zellen in DNFB-sensibilisierte BALB/c Mäuse intravenös injiziert. Bei der Negativkontrolle (Neg. Ktrl.) erfolgte die lokale Reaktivierung in nicht-sensibilisierten BALB/c Mäusen.

0.5 % Öl/DNFB-Emulsion: 20 µl DNFB / 3 ml Aceton / 1 ml Olivenöl

0.3 % Öl/DNFB-Emulsion: 12 µl DNFB / 3 ml Aceton / 1 ml Olivenöl

2.6 Histologie

Histologische Analysen wurden durchgeführt, um Entzündungsreaktionen im Darm pathologisch zu bewerten. Dafür wurden die Därme präpariert, in Standardeinbettkassetten (Engelbrecht, Edermünde) aufgerollt und in 4 % Paraformaldehyd

konserviert. Es wurden histologische Paraffinschnitte angefertigt, mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt, ausgewertet und photographisch dokumentiert (Kooperation mit Dr. Susanne Mauel und Prof. Dr. Achim Gruber; Freie Universität Berlin). Um Ergebnisse pathologisch miteinander vergleichen zu können, wurde der Schweregrad der Entzündung in verschiedene Kriterien eingeteilt und ein histologischer „Score“ erstellt (Tab. 2-8).

Tab. 2-8: Morphologische Bewertung der Pathologie des Dünndarms anhand der angegebenen Parameter. Die Pathologie wurde in die angegebenen Kriterien eingeteilt. Jedem Parameter wurde eine Punktzahl („Score“) zugeordnet. Der „Score“ wurde im Duodenum, Jejunum und Ileum angewendet. Die Summe der Punktzahlen ergibt den Schweregrad der Pathologie des Dünndarms.

Score	Infiltration mit Entzündungszellen	Ablösung der Epithelzellen	Zottenatrophie und Zottenfusion
0	ohne besonderen Befund	ohne besonderen Befund	ohne besonderen Befund
1	geringgradig	Ablösung einzelner Zellen	geringgradig
2	gering- mittelgradig	Ablösung von Zellgruppen	gering- mittelgradig
3	mittelgradig	Ablösung von Zellgruppen mit einzelnen Erosionen	mittelgradig
4	mittel- hochgradig	Großflächige Ablösung mit Erosionen	mittel- hochgradig
5	hochgradig		hochgradig

ERGEBNISSE

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Aktivierung von Darmantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgenen Mäusen

Der adoptive Transfer von HA-spezifischen transgenen CD8⁺ T-Zellen aus CL4-TCR transgenen Mäusen in VILLIN-HA transgene Mäuse führt zu einer CD8⁺ T-Zell-vermittelten Antigen-spezifischen intestinalen Entzündung (Westendorf *et al.*, 2006). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde untersucht in welchen mukosalen Kompartimenten die Aktivierung von CD8⁺ Effektor T-Zellen stattfindet und welche Zellen an der Aktivierung beteiligt sind.

3.1.1 Rolle von mesenterischen Lymphknoten bei der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen

In der Literatur ist beschrieben, dass apoptotische intestinale Epithelzellen von Dendritischen Zellen in der Lamina propria aufgenommen und zur Präsentation gegenüber Antigen-spezifischen Lymphozyten in den Darm-drainierenden MLN transportiert werden (Huang *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, ob das epitheliale Darmantigen Hemagglutinin in VILLIN-HA transgenen Mäusen von DCs in den MLN über MHC-Klasse-I-Komplexe präsentiert wird und naive HA-spezifische CD8⁺ T-Zellen bei der Interaktion mit DCs aus den MLN von VILLIN-HA transgenen Mäusen aktiviert werden, wurden DCs aus den MLN und der Milz von VILLIN-HA transgenen Mäusen und nicht-transgenen Geschwistertieren isoliert und mit naiven HA-spezifischen CFSE-markierten CD8⁺CD25⁻ T-Zellen *in vitro* ko-kultiviert. Nach vier Tagen wurde die Proliferation von HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes bestimmt.

Die Interaktion von HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit DCs aus den MLN von VILLIN-HA transgenen Mäusen führt zur Proliferation von naiven HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, während die Ko-Kultivierung mit DCs aus der Milz von VILLIN-HA transgenen Mäusen keine Aktivierung von HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen induziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass das intestinale Modellantigen HA in VILLIN-HA transgenen Mäusen in die MLN transportiert und dort von DCs präsentiert wird.

Weiterhin wird deutlich, dass intestinale Antigene in diesem Mausmodell nicht in die Milz transportiert werden und die Milz daher vermutlich keinen direkten Einfluss auf die Induktion von mukosalen Immunantworten hat.

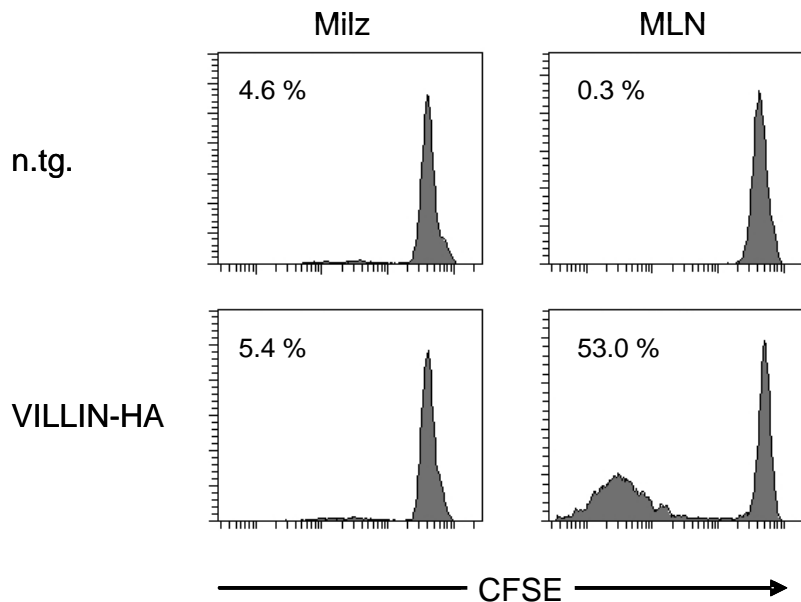


Abb. 3-1: Aktivierung von naiven HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch Ko-Kultivierung mit DCs aus den MLN von VILLIN-HA transgenen Mäusen. 2.5×10^5 naive HA-spezifische CD8⁺ T-Zellen aus CL4-TCR transgenen Mäusen wurden mit CFSE markiert und mit 0.5×10^5 DCs aus den MLN oder der Milz von VILLIN-HA transgenen Mäusen oder nicht-transgenen (n.tg.) Geschwistertieren ko-kultiviert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen mit anti-CD8 Antikörpern gefärbt und die Proliferation der HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes durchflusszytometrisch bestimmt. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Die Ergebnisse in Abb. 3-1 verdeutlichen die essentielle Rolle der MLN bei der Aktivierung von naiven HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgenen Mäusen. Um die Funktion der MLN für die Induktion von mukosalen Immunantworten ausführlicher zu untersuchen, wurde die operative Resektion der MLN etabliert. Die MLN aus VILLIN-HA transgenen Mäusen und nicht transgenen Geschwistertiere wurden operativ entfernt (Abb. 3-2). Nach einer zweiwöchigen Regenerationsphase zur Wiederherstellung des Lymphsystems wurde der adoptive Transfer von naiven HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in MLN-defiziente, unbehandelte VILLIN-HA transgene Mäuse und nicht-transgene Geschwistertiere durchgeführt. Um erste Anzeichen einer intestinalen Entzündung festzustellen, wurde nach dem T-Zell-Transfer täglich das Gewicht der Empfängertiere bestimmt.

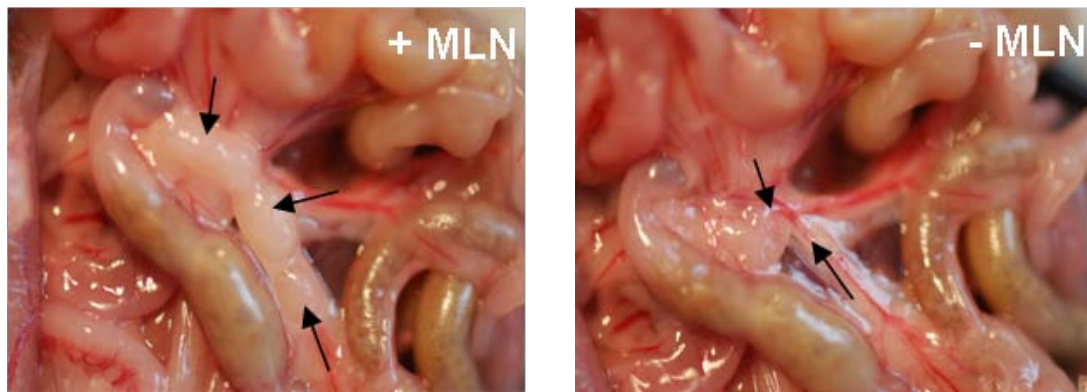


Abb. 3-2: Photographische Darstellung des Mesenteriums vor (+ MLN) und nach der operativen Resektion der MLN (- MLN) in Mäusen.

Während das Gewicht der nicht-transgenen Kontrolltiere stabil blieb, führte der Transfer von $CD8^+$ T-Zellen sowohl in den unbehandelten als auch in den MLN-defizienten VILLIN-HA Mäusen nach vier Tagen zu einer Gewichtsreduktion um 6-8 % (Abb. 3-3A) und blutiger Diarrhö. Um den Schweregrad der intestinalen Entzündung zu bestimmen, wurden die Empfängertiere an Tag 4 nach adoptivem Transfer getötet und der Dünndarm histologisch pathologisch untersucht. Interessanterweise konnten keine signifikanten Unterschiede im Schweregrad der Entzündung zwischen VILLIN-HA und MLN-defizienten VILLIN-HA transgenen Empfängertieren detektiert werden (Abb. 3-3B). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Antigenpräsentation und die Aktivierung von $CD8^+$ Effektor T-Zellen im VILLIN-HA transgenen Mausmodell nicht auf die MLN beschränkt sind, sondern auch in anderen lymphoiden Strukturen induziert werden können.

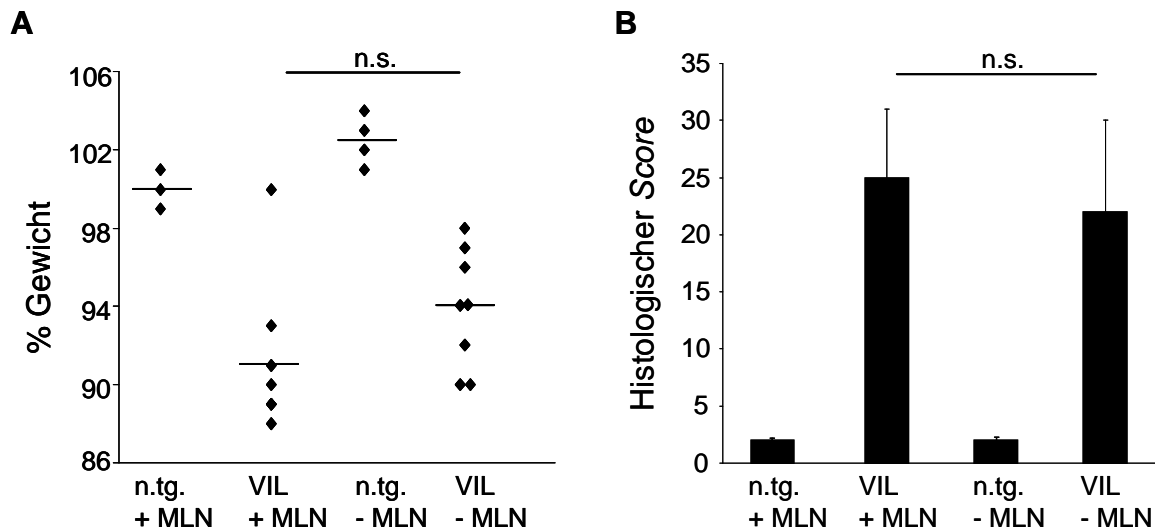


Abb. 3-3: Rolle der MLN bei der CD8⁺ T-Zell-vermittelten intestinalen Entzündung in VILLIN-HA transgenen Mäusen. Resektion der MLN aus VILLIN-HA (VIL) und nicht-transgenen Geschwistertieren (n.tg.). Zwei Wochen nach der Resektion wurden CD8⁺ T-Zellen aus CL4-TCR Mäusen i.v. in MLN-defiziente (n=8) und unbehandelte (n=6) VILLIN-HA transgene Mäuse sowie in MLN-defiziente (n=4) und unbehandelte (n=3) nicht-transgene Geschwistertiere injiziert. (A) Prozentualer Anteil des Körpergewichts vom Ausgangsgewicht der Empfängertiere an Tag 4 nach adoptivem Transfer. (B) Vier Tage nach adoptivem Transfer wurde der Dünndarm der Empfängertiere in Paraffin eingebettet, Dünnschnitte angefertigt, mit Hämatoxylin & Eosin (H&E) gefärbt und der histologische „Score“ bestimmt.

3.1.2 Rolle der Peyer'schen Platten und Lamina propria bei der Aktivierung von HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgenen Mäusen

In Kapitel 1.1.2 „Das Darm-assoziierte lymphoide Gewebe (GALT)“ wurde beschrieben, dass neben den MLN auch die PP als Induktionsort von mukosalen Immunantworten fungieren. Um zu untersuchen, ob die Aktivierung von naiven HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgenen Mäusen auch in den PP stattfindet, wurde das Pharmakon FTY720 angewendet. FTY720 hemmt die natürliche Auswanderung von Lymphozyten aus lymphoiden Organen in das Blut und resultiert in einem Mangel an Lymphozyten im Blut (Lymphopenie). Der Wirkmechanismus von FTY720 beruht auf dessen Phosphorylierung durch das Enzym Sphingosin-Kinase-2 und anschließender Bindung an die Sphingosin-1-phosphat-Rezeptoren S1P1, S1P3, S1P4 und S1P5, die auf der Oberfläche von T- und B-Lymphozyten exprimiert werden. Die Bindung von phosphoryliertem FTY720 an Sphingosin-1-phosphat-Rezeptoren bewirkt deren Internalisierung. Dadurch wird die S1P1-abhängige Auswanderung von Lymphozyten aus den Lymphknoten ins Blut verhindert (Matloubian *et al.*, 2004; Brinkmann *et al.*, 2004). FTY720 wirkt weder

apoptotisch auf Immunzellen noch behindert es deren Proliferation. Worbs *et al.* zeigen, dass auch die Auswanderung von Lymphozyten aus den PP in die MLN durch FTY720 unterdrückt wird (Worbs *et al.*, 2006).

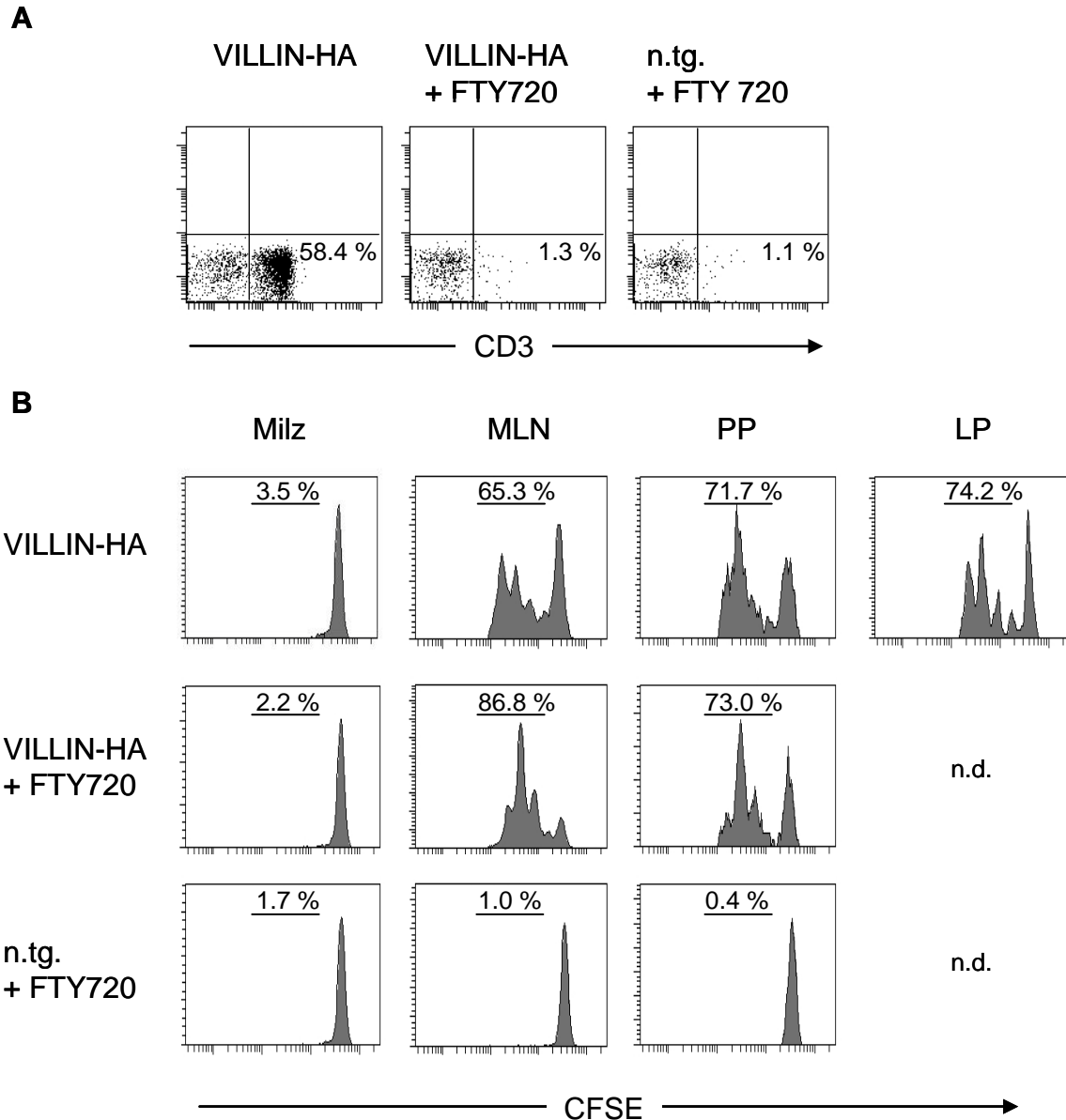


Abb. 3-4: Aktivierung HA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in den mesenterischen Lymphknoten und Peyer'schen Platten von VILLIN-HA transgenen Mäusen. (A) Peripheres Blut von FTY720-behandelten und unbehandelten VILLIN-HA transgenen Mäusen sowie FTY720-behandelten nicht-transgenen (n.tg.) Geschwistertieren wurden mit anti-CD3 Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (B) An Tag zwei nach adoptivem Transfer von CFSE-markierten HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden Lymphozyten aus Milz, mesenterischen Lymphknoten (MLN), Peyer'schen Platten (PP) und Lamina propria (LP) isoliert und der Anteil proliferierender HA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (n.d., nicht detektierbar). Repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Diese Methode bietet die Möglichkeit zu untersuchen, ob die Aktivierung von HA-spezifischen T-Zellen in VILLIN-HA transgenen Mäusen auch in den PP stattfindet

oder ob diese Zellen erst nach Aktivierung in die PP einwandern. VILLIN-HA transgene Mäuse und nicht-transgene Geschwistertiere wurden für 5 Tage oral mit 1 mg/kg Körpergewicht FTY720 behandelt.

Abbildung 3-4A zeigt die Lymphopenie in FTY720 behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren. An Tag 5 wurde der adoptive Transfer von CFSE-markierten HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in FTY720-behandelte und unbehandelte VILLIN-HA transgene Mäuse sowie FTY720-behandelte nicht-transgene Geschwistertiere durchgeführt und die tägliche Behandlung mit FTY720 fortgeführt. Zwei Tage nach dem adoptiven Transfer wurden Lymphozyten aus der Milz, den MLN, den PP und der LP der Empfängertiere isoliert und der Anteil proliferierender HA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

In unbehandelten VILLIN-HA Empfängertieren konnten in allen Kompartimenten des mukosalen Immunsystems proliferierende HA-spezifische CD8⁺ T-Zellen detektiert werden (Abb. 3-4B). Interessanterweise wurden auch in FTY720 behandelten VILLIN-HA transgenen Tieren proliferierende HA-spezifische CD8⁺ T-Zellen in den MLN und den PP nachgewiesen. Diese Ergebnisse belegen, dass naive HA-spezifische CD8⁺ T-Zellen nicht nur in den MLN sondern auch direkt in den PP von VILLIN-HA transgenen Mäusen aktiviert werden können. Das Fehlen HA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der LP von FTY720-behandelten im Vergleich zu unbehandelten Tieren zeigt, dass die Migration der injizierten CD8⁺ T-Zellen aus den Lymphknoten in die Peripherie durch die orale Applikation von FTY720 erfolgreich blockiert wurde.

In Arbeiten von Niess *et al.* wurde gezeigt, dass intestinale Antigene auch direkt von LP DCs im darm-assoziierten lymphoiden Gewebe präsentiert werden (Niess *et al.*, 2008; Niess *et al.*, 2005). Um zu untersuchen, ob auch DCs aus der LP von VILLIN-HA transgenen Mäusen das epitheliale Darmantigen HA präsentieren und HA-spezifische CD8⁺ T-Zellen aktivieren können, wurden DCs aus der LP von VILLIN-HA transgenen und nicht-transgenen Geschwistertieren isoliert und mit naiven CFSE-markierten HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen *in vitro* ko-kultiviert. Nach fünf Tagen wurde die Proliferation von HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes bestimmt.

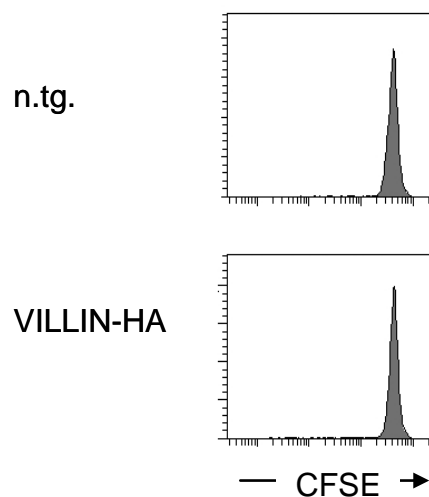


Abb. 3-5: Aktivierung von naiven HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch Ko-Kultivierung mit DCs aus der Lamina propria von VILLIN-HA transgenen Mäusen. 2.5×10^5 naive HA-spezifische CD8⁺ T-Zellen aus CL4-TCR transgenen Mäusen wurden mit CFSE markiert und mit 0.5×10^5 DCs aus der Lamina propria von VILLIN-HA transgenen Mäusen oder nicht-transgenen (n.tg.) Geschwistertieren ko-kultiviert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen mit anti-CD8 Antikörpern gefärbt und die Proliferation der HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes durchflusszytometrisch bestimmt. Histogramme zeigen die Intensität des CFSE Farbstoffes innerhalb von CFSE-markierten CD8⁺ T-Zellen. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Niess *et al.* besitzen DCs aus der LP von VILLIN-HA transgenen Mäusen nicht die Fähigkeit naive HA-spezifische CD8⁺ T-Zellen *in vitro* zu aktivieren.

Das Kompartiment, in dem die Aktivierung von T-Zellen stattfindet, ist entscheidend für die Differenzierung der T-Zell-Antwort. Für das mukosale Immunsystem wurde beschrieben, dass Antigene in der Mukosa von spezialisierten DCs aufgenommen werden, diese in die MLN migrieren und dort eine effiziente CD8⁺ Effektor T-Zell-Antwort induzieren. Die Untersuchungen im VILLIN-HA transgenen Mausmodell belegen diese These. Zusätzlich konnte aber auch gezeigt werden, dass neben den MLN weitere lymphoide Strukturen wie die PP für die Induktion von CD8⁺ Effektor T-Zell-Antworten entscheidend sein können. Die Milz dagegen ist für das mukosale Immunsystem eher redundant, da es in der Milz im VILLIN-HA transgenen Mausmodell nicht zur Präsentation des intestinalen Antigens kommt.

3.2 Induktion von CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen

Die größte Herausforderung für das GALT besteht im Ausgleich von Abwehr- und Toleranzmechanismen gegenüber der Vielzahl verschiedener Antigene. Für die Aufrechterhaltung dieses sensiblen Gleichgewichtes sind Tregs von entscheidender Bedeutung, da ihr Fehlen die Entwicklung einer CEDE prädisponiert. Während bereits verschiedene CD4⁺ Treg-Populationen, die zur Kontrolle einer intestinalen Entzündung beitragen, ausführlich beschrieben und charakterisiert wurden, ist die Rolle von CD8⁺ immunsuppressiven T-Zellen bei der intestinalen Homöostase bisher nur wenig untersucht.

3.2.1 Induktion von CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen *in vivo*

Um den prozentualen Anteil natürlicher CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen im Vergleich zu natürlichen CD4⁺Foxp3⁺ Tregs im gesunden Individuum zu bestimmen, wurden Lymphozyten aus der Milz, den axialen Lymphknoten und den MLN von BALB/c Mäusen isoliert, mit Antikörpern gegen CD8, CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3-6).

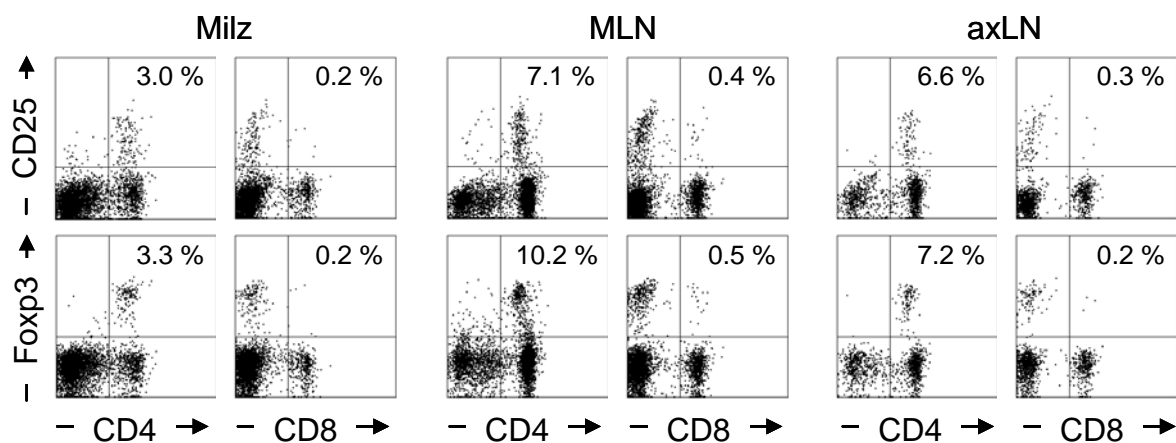


Abb. 3-6: CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen in der Peripherie im gesunden Individuum. Lymphozyten wurden aus der Milz, den mesenterischen (MLN) und axialen Lymphknoten (axLN) von BALB/c Mäusen isoliert, mit Antikörpern gegen CD8, CD4, CD25 und intrazelluläres Foxp3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Während der prozentuale Anteil $CD4^+Foxp3^+$ und analog $CD4^+CD25^+$ Tregs in der gesunden Maus je nach Organ zwischen 3.0 % und 10.2 % liegt, ist der prozentuale Anteil $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen mit 0.2 % bis 0.5 % sehr gering. In einer vorherigen Arbeit konnten wir bereits zeigen, dass die chronische Präsentation von HA als Autoantigen in intestinalen Epithelzellen in VILLIN-HA/CL4-TCR transgenen Mäusen zur Infiltration von HA-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen in die intestinale Mukosa führt ohne eine schwere Darmentzündung zu vermitteln. Die phänotypische Charakterisierung der HA-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen in diesen Tieren zeigt, dass es zur Induktion von HA-spezifischen $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen kommt (Westendorf *et al.*, 2006). Um zu untersuchen, ob die Foxp3 Expression in HA-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen bereits im Thymus induziert wird oder auf die Aktivierung im GALT zurückzuführen ist, wurde der adoptive Transfer von HA-spezifischen naiven $CD8^+$ T-Zellen aus CL4-TCR/Foxp3/GFP transgenen Mäusen in VILLIN-HA und nicht-transgene Geschwistertiere durchgeführt. Bei Foxp3/GFP transgenen Mäusen werden Foxp3⁺ Zellen durch die Expression von GFP identifiziert. An Tag 4 und 5 nach Transfer wurden die Lymphozyten aus der Milz, den MLN, der LP und den PP isoliert und der Anteil $CD8^+Foxp3^+/GFP^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Der adoptive Transfer von HA-spezifischen naiven $CD8^+Foxp3^-/GFP^-$ T-Zellen in VILLIN-HA transgene Mäuse führt zur Induktion von $CD8^+Foxp3^+/GFP^+$ T-Zellen (Abb. 3-7). Deren Anteil ist in der Milz sehr gering (0.1 % - 0.3 %), in der LP dagegen am größten (bis zu 52.2 %). Die starke Zunahme $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen im GALT zeigt, dass die Expression von Foxp3 in HA-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen von VILLIN-HA/CL4-TCR transgenen Mäusen nicht bereits im Thymus sondern erst in der Peripherie induziert wird.

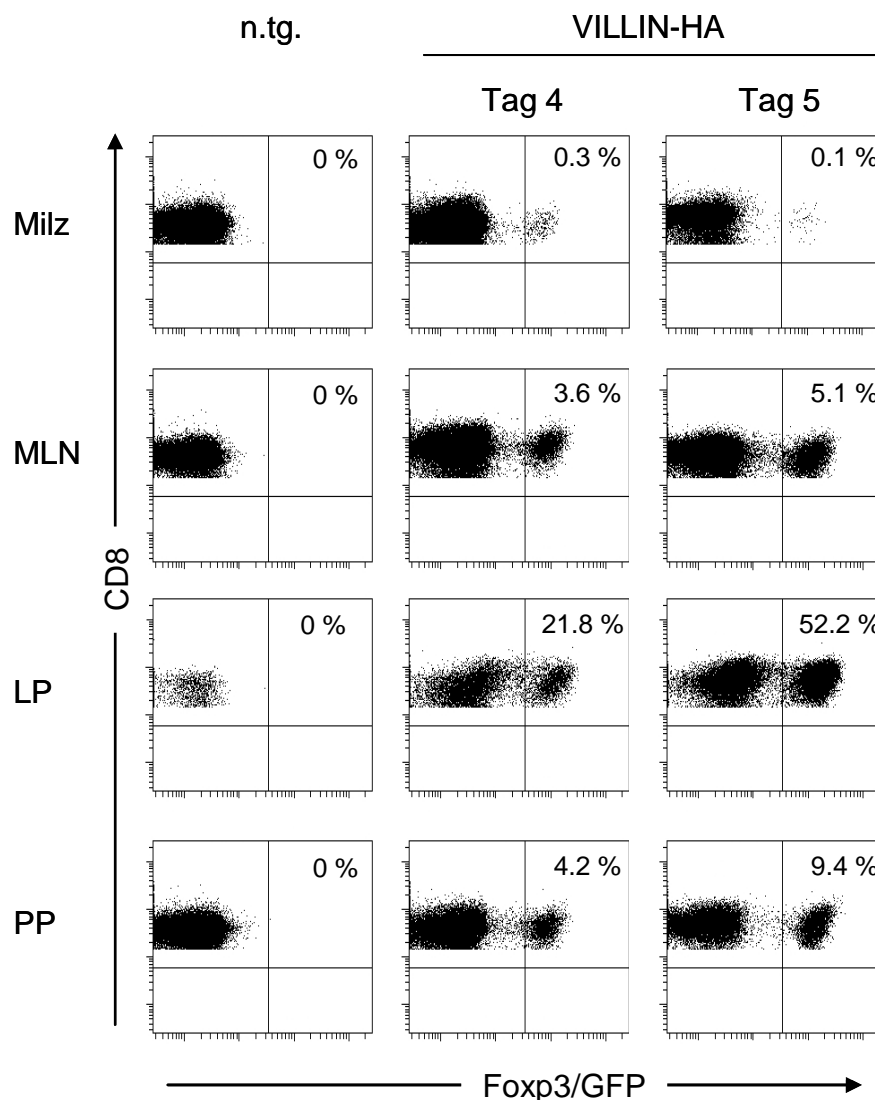


Abb. 3-7: Periphere Induktion von HA-spezifischen CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgenen Mäusen. 2×10^6 HA-spezifische CD8⁺CD25⁻ T-Zellen aus CL4-TCR/Foxp3/GFP transgenen Mäusen wurden i.v. in VILLIN-HA und nicht-transgene (n.tg.) Geschwistertiere injiziert. An Tag 4 und 5 nach adoptivem Transfer wurden die Lymphozyten aus der Milz, den mesenterischen Lymphknoten (MLN), der Lamina propria (LP) und den Peyer'schen Platten (PP) isoliert, mit Antikörpern gegen CD8 gefärbt und Foxp3/GFP durchflusszytometrisch analysiert. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

3.2.2 Induktion von CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen *in vitro*

DCs als professionelle Antigen-präsentierende Zellen bestimmen durch die direkte Interaktion mit T-Zellen, ob eine inflammatorische oder tolerogene Immunreaktion ausgelöst wird. Dabei ist der Aktivierungszustand der DC zum Zeitpunkt der Interaktion mit der T-Zelle von entscheidender Bedeutung. Kürzlich wurde in zahlreichen Publikationen die Rolle von DCs bei der Induktion und Homöostase von Tregs beschrieben. Vor allem DCs des GALTs sind entscheidend an der peripheren

Induktion von $CD4^+Foxp3^+$ Tregs beteiligt (Ohnmacht *et al.*, 2009; Coombes *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007; Mahnke und Enke *et al.*, 2005; Fehervari und Sakaguchi *et al.*, 2004). Zwischen DCs und T-Zellen besteht numerisch und funktionell ein physiologischer Gleichgewichtszustand. Dieser wird durch direkte Regulationsmechanismen aufrechterhalten (Darrasse-Jeze *et al.*, 2009). Wie in Abb. 3-1 gezeigt, besitzen DCs aus den MLN von VILLIN-HA transgenen Mäusen die Fähigkeit, das intestinale Modellantigen HA zu präsentieren und naive HA-spezifische $CD8^+$ T-Zellen zu aktivieren. Um die Rolle von Darm-assoziierten DCs bei der Induktion von HA-spezifischen $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen zu untersuchen, wurden DCs aus den MLN von VILLIN-HA transgenen und BALB/c Mäusen isoliert und *in vitro* mit naiven CFSE-markierten HA-spezifischen $CD8^+CD25^-$ T-Zellen ko-kultiviert. Nach fünf Tagen wurde die Proliferation von HA-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes bestimmt und die Foxp3 Expression in proliferierenden $CD8^+$ T-Zellen ermittelt. Interessanterweise besitzen die HA-präsentierenden DCs aus den MLN von VILLIN-HA transgenen Mäusen die Fähigkeit eine kleine Population $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen zu induzieren (Abb. 3-8).

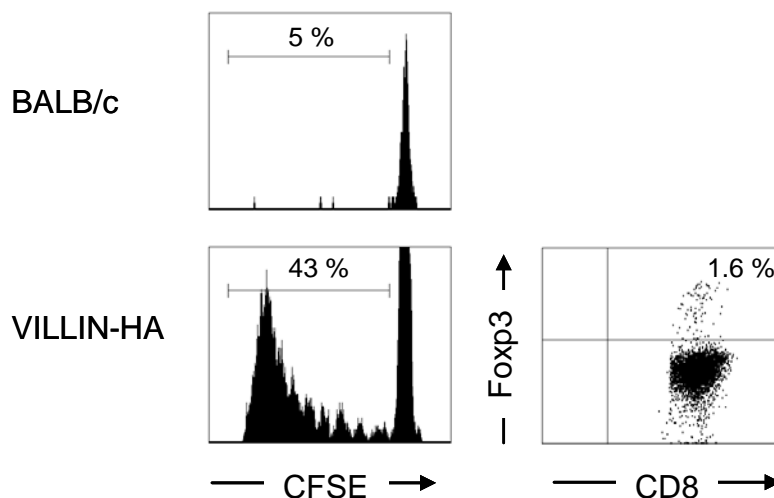


Abb. 3-8: Induktion von HA-spezifischen $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen durch MLN DCs *in vitro*. 5×10^4 DCs aus den MLN von VILLIN-HA transgenen und BALB/c Mäusen wurden mit 2.5×10^5 CFSE-markierten HA-spezifischen $CD8^+CD25^-$ T-Zellen aus CL4-TCR transgenen Mäusen ko-kultiviert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD8 und intrazelluläres Foxp3 gefärbt. Die Proliferation von $CD8^+$ T-Zellen wurde anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes bestimmt und in Form von Histogrammen dargestellt. Der „dot plot“ zeigt die Expression von Foxp3 in proliferierenden $CD8^+$ T-Zellen. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

3.2.3 TGF- β /Retinsäure-vermittelte Induktion von CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen *in vitro*

In Kapitel 1.2.4 „Induktion von Tregs in der intestinalen Mukosa“ ist beschrieben, dass die Aktivierung von naiven CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen in Anwesenheit von TGF- β und RA zur Konvertierung in Foxp3-exprimierende CD4⁺ Tregs führt.

Um zu untersuchen, ob TGF- β und RA auch bei CD8⁺ T-Zellen die Expression von Foxp3 induzieren, wurden CFSE-markierte HA-spezifische CD8⁺Foxp3⁻ T-Zellen in Anwesenheit von TGF- β und RA allein oder der Kombination aus TGF- β und RA mit HA-Peptid aktiviert. Nach vier Tagen wurde der Anteil CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen in proliferierenden CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

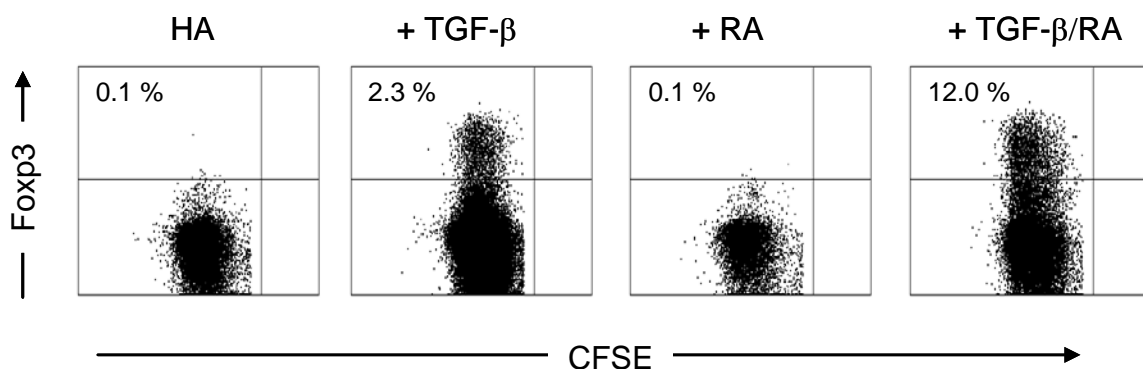


Abb. 3-9: TGF- β /RA-vermittelte Induktion von HA-spezifischen CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen *in vitro*. 5×10^4 DCs aus der Milz von BALB/c Mäusen wurden mit 2.5×10^5 CFSE-markierten HA-spezifischen CD8⁺CD25⁻ T-Zellen aus CL4-TCR transgenen Mäusen mit 0.01 μ g/ml exogenem HA-Peptid kultiviert. Wenn angegeben wurden 2 ng/ml humanes rTGF- β oder 100 nM RA hinzugegeben. Nach vier Tagen wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD8 und intrazelluläres Foxp3 gefärbt. Die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen wurde anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes bestimmt. Die „dot plots“ zeigen die Expression von Foxp3 in proliferierenden CD8⁺ T-Zellen. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Wie in Abb. 3-9 dargestellt, führt die Aktivierung von HA-spezifischen CD8⁺Foxp3⁻ T-Zellen in Anwesenheit von HA-Peptid allein oder in Kombination mit RA nicht zur Induktion von CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen (0.1 % / 0.1 %). Im Gegensatz dazu führt die Aktivierung von CD8⁺Foxp3⁻ T-Zellen mit HA-Peptid und TGF- β zur Induktion einer kleinen Population CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen (2.3 %). Die TGF- β vermittelte Induktion von Foxp3 in CD8⁺ T-Zellen wird durch die Anwesenheit von RA deutlich verstärkt (12.0 %).

Analog zur Induktion von Antigen-spezifischen CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen sollte untersucht werden, ob auch polyklonale CD8⁺Foxp3⁻ T-Zellen in Anwesenheit von

TGF- β und RA in CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen konvertiert werden können. Polyklonale CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen wurden aus der Milz von Foxp3/GFP transgenen Mäusen isoliert und mit anti-CD3 aktiviert. TGF- β und RA wurden entweder allein oder in Kombination hinzugefügt. Nach vier Tagen wurde der Anteil CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen innerhalb der CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 3-10).

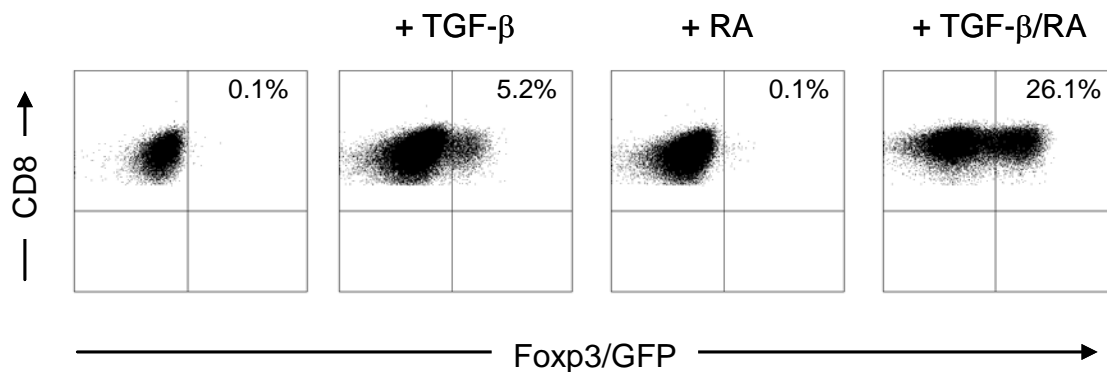


Abb. 3-10: TGF- β /RA-vermittelte Induktion von polyklonalen CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen *in vitro*. 2.5×10^5 CD8⁺CD25⁻ T-Zellen aus Foxp3/GFP transgenen Mäusen wurden mit 5×10^4 DCs aus der Milz von BALB/c Mäusen ko-kultiviert und mit 0.5 μ g/ml anti-CD3 polyklonal aktiviert. Wenn angegeben wurden 2 ng/ml humanes rTGF- β oder 100 nM RA hinzugegeben. Nach vier Tagen wurde die Expression von CD8 und Foxp3/GFP durchflusszytometrisch analysiert. Die „dot plots“ zeigen die Expression von Foxp3/GFP in CD8⁺ T-Zellen. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Die Aktivierung mit anti-CD3 allein oder anti-CD3 und RA führt wie bei der Antigen-spezifischen Aktivierung nicht zur Induktion von CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen (jeweils 0.1 %). Die TCR-vermittelte Aktivierung von CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen in Anwesenheit von TGF- β induziert bei 5.2 % der CD8⁺ T-Zellen die Expression von Foxp3/GFP. In Anwesenheit von TGF- β und RA führt die Aktivierung von CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen zu einer signifikanten Konvertierung in CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen (26.1 %).

3.2.4 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen

Um zu untersuchen, ob die induzierte Expression von Foxp3 in den CD8⁺ T-Zellen mit einem regulatorischen Phänotyp verbunden ist, wurden TGF- β /RA-induzierte CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer Funktionalität im Vergleich zu TGF- β /RA-behandelten CD8⁺Foxp3⁻ T-Zellen näher charakterisiert.

Polyklonale $CD8^+Foxp3^-/GFP^-$ T-Zellen wurden aus der Milz von Foxp3/GFP transgenen Mäusen isoliert und in Anwesenheit von TGF- β und RA mit anti-CD3 aktiviert. Wie in Abb. 3-11 dargestellt, wurden die $CD8^+$ T-Zellen an Tag 4 entsprechend der Expression von Foxp3/GFP in $CD8^+Foxp3^-/GFP^-$ und $CD8^+Foxp3^+/GFP^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch sortiert und für die nachfolgenden phänotypischen und funktionellen Analysen verwendet.

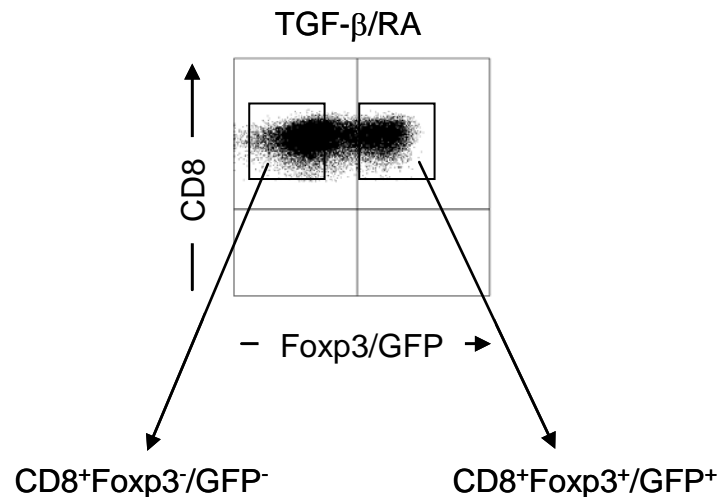


Abb. 3-11: Durchflusszytometrische Sortierung von TGF- β /RA-behandelten $CD8^+$ T-Zellen in $CD8^+Foxp3^-/GFP^-$ und $CD8^+Foxp3^+/GFP^+$ T-Zellen. 2×10^6 $CD8^+CD25^-$ T-Zellen aus Foxp3/GFP transgenen Mäusen wurden mit 4×10^5 DCs aus der Milz von BALB/c Mäusen kultiviert und mit 0.5 μ g/ml anti-CD3 in Anwesenheit von 2 ng/ml TGF- β und 100 nM RA polyklonal aktiviert. An Tag 2 wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 gesplittet und mit 50 U/ml IL-2 behandelt. Nach vier Tagen wurden die Zellen bezüglich der Expression von CD8 und Foxp3/GFP in $CD8^+Foxp3^-/GFP^-$ und $CD8^+Foxp3^+/GFP^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch sortiert. Der „dot plot“ zeigt die sortierten Populationen.

3.2.4.1 Transkriptomanalyse von TGF- β /RA-induzierten $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen

Für die Bestimmung des Phänotyps von TGF- β /RA-induzierten $CD8^+Foxp3^+/GFP^+$ T-Zellen im Vergleich zu TGF- β /RA-behandelten $CD8^+Foxp3^-/GFP^-$ T-Zellen wurden zunächst auf molekularer Ebene Transkriptomanalysen unter Anwendung der „Agilent gene expression chip“-Technologie durchgeführt. Differentiell exprimierte Gene wurden berücksichtigt, wenn sich die Expressionsstärke mindestens um den Faktor 2 unterschied. Die aus den Transkriptomdaten erstellte „heat map“ spiegelt das komparative Genexpressionsprofil, also alle differentiell exprimierten Gene von TGF- β /RA-induzierten $CD8^+Foxp3^+/GFP^+$ gegenüber $CD8^+Foxp3^-/GFP^-$ T-Zellen, wider (Abb. 3-12).

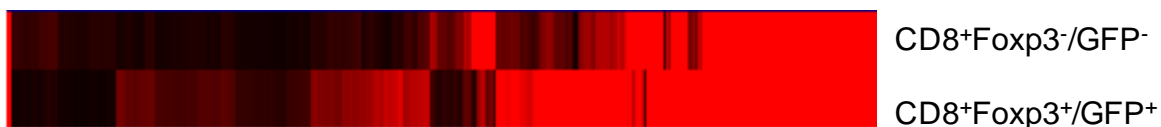


Abb. 3-12: Genexpressionsanalyse von TGF- β /RA-behandelten CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen. TGF- β /RA-behandelte CD8⁺ T-Zellen wurden in CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻- und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch sortiert und Transkriptomanalysen wurden mittels der „Agilent gene expression chip“-Technologie durchgeführt. Die „heat map“ illustriert differentielle Genexpressionsstärken (Regulationsfaktor ≥ 2); schwarz symbolisiert eine schwache Expression, rot eine starke Expression.

Von insgesamt 608 differentiell exprimierten Genen sind für die vorliegende Fragestellung nur die Gene von Interesse, die in Verbindung mit Immunsystemprozessen wie z.B. Aktivierung, Proliferation, Differenzierung, Homöostase, Migration, Zytokinfreisetzung und Apoptoseinduktion stehen. Eine Auswahl dieser Gene ist exemplarisch in Tab. 3-1 dargestellt.

Tab. 3-1: Funktionelle Kategorisierung ausgewählter, differentiell exprimierter Gene zwischen TGF- β /RA-behandelten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ und CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen. Gene mit einer Signalintensität über 20 in einer der beiden Zellpopulationen und gleichzeitig einem Regulationsfaktor von mindestens 2 wurden berücksichtigt.

		Signalintensität		
Genname	Reg.-faktor	GFP-	GFP ⁺	Beschreibung
Kostimulatorische Signalwege				
CTLA-4	2.71	436	1288	bindet an CD80/CD87 auf DCs; inhibierender Effekt auf T-Zellen; Überexpression auf Tregs
ICOS	2.09	395	901	exprimiert nach T-Zell-Aktivierung; bewirkt Proliferation und Zytokinproduktion
OX40	3.23	1936	6813	transient induziert nach T-Zell-Aktivierung; auch auf Tregs exprimiert; wichtig bei Entwicklung und Homöostase von Tregs; trägt zu effektiver Treg-vermittelter Suppression bei; Bindung von OX40 durch OX40Ligand führt zur Proliferation von Tregs und hebt ihre regulatorische Aktivität
CD24a	2.86	374	1169	auf verschiedenen Zelltypen exprimiert; Funktion vielseitig und abhängig vom Zelltyp; positives Regulationselement der homeostatischen Proliferation

				von T-Zellen; CD24-vermittelte Apoptose; erhöhte Expression nach Behandlung mit Retinsäure in embryonalen Stammzellen
CD63	2.13	85	196	induziert bei T-Zell-Aktivierung; CD63-vermittelte Kostimulation unabhängig von CD28-abhängigen kostimulatorischen Signalwegen
CD69	2.20	2336	5610	früher und transienter Marker für T-Zell-Aktivierung
CD7	-3.45	902	285	Aktivierungsmarker auf T-Zellen; erforderlich für Galectin-1-vermittelte Apoptose in T-Zellen
CD81	5.83	129	820	auf Leukozyten exprimiert; beteiligt an verschiedenen Zellprozessen wie Adhäsion, Aktivierung; Proliferation und Differenzierung; induziert nach T-Zell-Aktivierung; Ko-stimulatorisches Molekül unabhängig von CD28
Tnfrsf9	2.37	2801	7229	exprimiert auf verschiedenen Immunzellen nach Aktivierung, u.a. auch auf Tregs; Kostimulation steht im Zsh. mit Treg-Funktionalität; Tnfrsf9-abhängige Inhibierung von aktivierten CD4 ⁺ Tregs bei einem „graft-versus-host“ Modell
LIGHT	-2.97	497	183	proinflammatorisch; kostimulatorisches Molekül für Effektorzellen
Ly-6c	-3.34	591	193	exprimiert auf CD8 ⁺ T-Zellen; fungiert in Synergie mit CD3-T-Zell-Rezeptorkomplex; beteiligt an der zytotoxischen T-Zell-vermittelten Apoptose in Zielzellen; Ly-6C Expression korreliert mit erhöhter IFN- γ Produktion

Rezeptoren

Gpr83	15.56	48	820	spezifisch auf Tregs und nicht auf aktivierten T-Zellen exprimiert; Ligand unbekannt
Nrp1	6.99	3	23	spezifisch auf Tregs und nicht auf aktivierten T-Zellen exprimiert; Ligand ist VEGF

Transkriptionsregulation und DNA Bindung

T-bet	-2.08	3992	2090	T _H 1-spezifischer Transkriptionsfaktor
Tcf7	-2.78	2578	1013	T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor; Downstream Effektormolekül des WNT-Signalweges; Bindung an Promotor von proinflammatorischen Genen
Atf3	5.99	51	332	zentrale Rolle bei Runterregulierung einer Entzündungsreaktion
Nfil3	2.14	1043	2441	induziert im IL-3 Signalweg; essentiell für Entwicklung von NK-T-Zelldifferenzierung; Nfil3-defiziente NK T-

				Zellen zeigen reduzierte zytolytische Aktivität
Axud1	2.33	1305	3314	starke Expression in T-Zellen bei Bindung von IL-2
Runx1	3.09	13	42	beteiligt am Transport von Foxp3 in den Zellkern; Runx Gene werden durch TGF- β induziert; Runx Transkriptionsfaktoren sind Verbindungsmoleküle bei der TGF- β -induzierten Foxp3 Expression in iTregs
Pou2af1	-2.63	1019	422	wichtig für T _H -Zellfunktion; bei Pou2af1-defizienten Mäusen ist die Expression von T _H 1-Zytokinen reduziert, T _H 2-Zytokine war erhöht; beteiligt an IFN- γ and IL-2 Promoter Aktivität
Crem	2.03	366	811	transkriptionelles Repressormolekül; wichtig für Termination einer T-Zellantwort durch Störung der IL-2 Expression; Hochreguliert in Foxp3 ⁺ T-Zellen; beteiligt an Zellkontakt-abhängiger Suppression

Signaltransduktionswege				
Lyn	5.15	94	526	Tyrosinproteinkinase; exprimiert in hematopoietischen und neuronalen Zellen; beteiligt bei Regulation der Zellaktivierung
Tgm2	4.82	259	1364	Transglutaminase; beteiligt an verschiedenen Zellprozessen wie Aktivierung, Apoptose, Endozytose, Wachstum und Differenzierung
Trib1	2.59	388	1099	beteiligt an der Regulation von NF- κ B and MAP Kinasen; reprimiert die Expression des IL-6 induzierenden Transkriptionsfaktors NF-IL6
Dusp4	2.97	471	1527	inaktiviert die MAP Kinasen ERK1, ERK2 and JNK
Prdx4	2.88	1138	3575	zytoplasmatisches Antioxidans; regulatorische Rolle bei der Aktivierung von NF- κ B
Plekho1	-2.20	2690	1337	interagiert mit Molekülen des Ras-MAPK/PI3K-Signalweges
A20	2.20	1283	3073	anti-inflammatorisch; A20 reguliert negativ die Signalübertragung vom T-Zell-Rezeptor zu NF- κ B; unterdrückt die T-Zell-Aktivierung
Apelin	2.20	216	520	autokrin und parakrin immunologisch aktives Peptid; bindet Orphanrezeptor APJ; inhibiert lymphozytische cholinerge Aktivität bei Immunantworten

Retinsäure-abhängige Signalwege				
Zytochrom P450	2.76	451	1355	Retinsäure-abhängiger Signalweg; katabolisiert Retinsäure
Glut-3	2.05	5116	11438	erleichtert Transport von Glukose und Ascorbinsäure durch Zellmembran; Retinsäure bewirkt Erhöhung von Glut-3 im Zytoplasma

Zytokin/Chemokinsignalwege				
RANTES	-3.37	882	285	inflammatorisch; lockt TH1-Zellen an
Ccr12	5.30	31	178	bindet die pro-inflammatorischen Chemokine Mip4, Mip1 und Mip3; beteiligt an der Migration von Lymphozyten in entzündete Gewebe
Cxcr6	-7.25	3315	499	bindet Cxcl16; Cxcl16 bewirkt Akkumulation von aktivierten CD8 ⁺ T-Zellen im entzündeten Gewebe
Socs2	2.60	688	1954	supprimiert Zytokinsignale; hochreguliert in anergen und regulatorischen Zellen
IL-18R1	2.31	79	199	bindet IL-18
CD25	2.78	1076	3264	bindet IL-2; wird hochreguliert nach Aktivierung; massive Expression auf Tregs
RANKL	2.24	83	203	auf aktivierten T-Zellen exprimiert; Aktivierung von DCs durch Bindung an RANK
Ebi3	2.16	202	474	Untereinheit der Zytokine: IL-27 und IL-35; ist ein downstream Ziel von Foxp3; Ebi3 ^{-/-} Tregs zeigen eingeschränkte regulatorische Aktivität
IFN- γ R2	-2.58	2755	1165	erforderlich für IL-12 Sekretion; Mutationen in IFN- γ R1 und IFN- γ R2 führt zu eingeschränkter IFN- γ Antwort
Rgs1	2.43	987	2618	inhibiert Chemokinsignale; hochreguliert in anergen T-Zellen und Tregs

Zytolyse/Apoptoseinduktion in Zielzellen				
GzmD	3.15	960	3300	zytolytisches Protein; Serin-Protease in den Granula von CTL und NK Zellen
GzmB	2.78	18155	55041	zytolytisches Protein; Serin-Protease in den Granula von CTL und NK Zellen; auch in bestimmten Tregpopulationen exprimiert
GzmC	2.14	115	269	zytolytisches Protein; Serin-Protease in den Granula von CTL und NK Zellen
Prf1	3.01	137	451	zytolytisches Protein; in den Granula von CTL und NK Zellen; perforiert bei Degranulation die Zellmembran der Zielzelle und formt eine Pore

Tag7	2.04	70	155	bildet einen stabilen Komplex mit Hsp70, der Apoptose in Zielzellen induzieren kann; Bindung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tag7 ⁺ T-Zellen an Hsp70 bewirkt Kontakt-abhängigen Zelltod
Hsp70A1	3.35	229	837	Tag7-Hsp70-Komplex als zytotoxisches Agens
CAPL	4.34	440	2082	Kalzium-bindendes Protein; exprimiert von verschiedenen Immunzellen; kann Hsp70 binden und dadurch die Interaktion mit Tag7 verhindern
Emilin2	2.08	5692	12949	pro-apoptotisches extrazelluläres Matrixprotein; erzeugt Apoptose in Tumorzellen nach Bindung an TRAIL Rezeptor DR4

Wachstumsfaktoren				
Hbegf	3.43	72	271	Heparin-bindend; von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten sekretiert; führt zur Stimulierung von Tumorzellen
Ecm1	2.05	651	1458	von verschiedenen Gewebszellen und T-Zellen sekretiert; Marker von nTregs; bewirkt Angiogenese und Tumorprogression

Zellzyklus/Proliferation/Vitalität				
Cdk6	-2.13	6203	3177	wichtig für Zellzyklusprogression
Dap	-2.03	3026	1627	pro-apoptotisch; Überexpression von DAP führt bei vielen Zelltypen zum Zelltod
Pim2	-2.69	7692	3120	anti-apoptotisch; positive Regulation der NF-κB Kaskade
Maf	3.16	35	122	pro-apoptotisch durch Transaktivierung von Kaspase 6; unterdrückt IL-12p35 Expression durch Störung der Translokalisierung von NF-κB in den Zellkern
DEP-1	2.39	435	1133	negativer Regulator für T-Zell-Rezeptorsignalwege und Proliferation
Rasgrp2	-2.21	10057	4971	aktiviert Ras; essentiell für T-Zell-Rezeptorsignalwege und Proliferation
Galektin-3	-2.60	4856	2041	Galaktose-bindendes Protein; von verschiedenen Zelltypen exprimiert; exprimiert auf Tregs; reguliert Apoptose

Das Ergebnis einer T-Zell-vermittelten Immunantwort ist von der Signalvermittlung durch aktivierende und inhibitorische kostimulatorische Moleküle abhängig. Die Vielfalt der kostimulatorischen Moleküle und ihre differentielle Expression

ermöglichen eine genaue Kontrolle über Aktivierung, Differenzierung und Effektorfunktion von T-Zellen. Die mRNA von CTLA-4, OX40 und Tnfrsf9, kostimulatorischen Molekülen, die einen inhibierenden Effekt auf die Zellproliferation und Viabilität haben und in CD4⁺Tregs verstärkt exprimiert werden, lag in CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen in größeren Mengen vor als in CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen. Darüber hinaus war die Expression von proinflammatorischem LIGHT und Ly-6, dessen Expression mit der Produktion von IFN- γ korreliert, in CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen reduziert. Das Expressionsprofil der kostimulatorischen Moleküle spiegelt einen anti-inflammatorischen Phänotyp der CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen wider.

Zytokine und deren Rezeptoren sowie Signalmechanismen, welche einerseits die Zytokinwirkung vermitteln und andererseits zur Regulation der Zytokinbiosynthese beitragen, spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion und Kontrolle von Immunantworten. CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen zeigten eine reduzierte Expression von entzündungsfördernden Genen wie T_H1-Zellen anlockendes RANTES und Cxcl16-bindendes Cxcr6. Weiterhin ist eine eingeschränkte pro-inflammatorische IFN- γ Expression anhand der reduzierten Expression des IFN- γ Rezeptors in CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen denkbar. Die erhöhte Expression von Socs2 und Rgs1 deutet zusätzlich auf ein beeinträchtigtes pro-inflammatorisches Zytokinprofil hin. Socs2 und Rgs1 sind Proteine, die Zytokinsignalwege reprimieren und in anergen und regulatorischen Zellen erhöht exprimiert werden. Der anti-apoptotische Phänotyp wird durch die erhöhte Expression von CD25 mRNA unterstützt.

Die Auswertung der Transkriptomerergebnisse bezüglich intrazellulärer Signalwege zeigt in TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ im Vergleich zu CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen die verringerte Expression von Genen, die die pro-inflammatorischen NF- κ B- und MAP-Kinase- Signalwege positiv regulieren (Rasgrp2, Plekho1, Tcf7 und Pim2). Darüber hinaus werden Gene, die einen inhibierenden Einfluss auf diese pro-inflammatorischen Signalwege ausüben (Maf, A20, Dusp4 und Trib1), in CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen stärker exprimiert. Der anti-inflammatorische Phänotyp wird durch die erhöhte Expression der transkriptionellen Repressormoleküle Atf3 und Crem sowie durch die verringerte Expression der pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren T-bet, Pou2af1 und Tcf7 unterstützt.

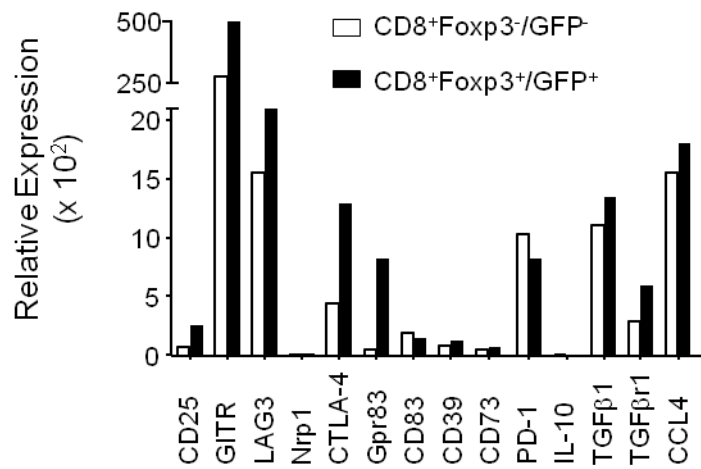
Die erhöhte Expression von inhibierenden kostimulatorischen Molekülen sowie NF κ B- und MAP-Kinase-Signalwege negativ regulierenden Molekülen wirkt sich negativ auf die IL-2 Produktion und Proliferation aus. Darüber hinaus wird der Schutz vor Apoptose reduziert. Die Transkriptomanalyse der Apoptose-regulierenden Gene zeigt eine erhöhte Maf und eine reduzierte Pim2 Expression an. Dies lässt eine erhöhte Suszeptibilität für Apoptose vermuten. Andererseits ist die mRNA des pro-apoptotischen Dap in CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen geringer exprimiert als in CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen.

Weiterhin legen die Transkriptomergebnisse eine eingeschränkte Proliferation von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen nahe. Gene, die für Zellproliferation essentiell sind (Cdk6, Rasgrp2), werden schwächer exprimiert, während das Zellproliferation inhibierende Gen (DEP-1) stärker exprimiert wird.

3.2.4.2 Expression von Treg-spezifischen Markermolekülen

Die in Tab. 3-1 dargestellten Transkriptomergebnisse deuten auf ein reduziertes inflammatorisches Potential von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen im Vergleich zu TGF- β /RA-behandelten CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen hin. Die Induktion von Foxp3 in TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen lässt die Differenzierung dieser Zellen in einen regulatorischen Phänotyp vermuten. Um zu untersuchen, ob TGF- β /RA-induzierte CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen ein ähnliches Genexpressionsprofil wie CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen aufweisen, wurde das Genexpressionsprofil der CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen hinsichtlich der Expression CD4⁺ Treg-spezifischer Markermoleküle analysiert. Wie in Abb. 3-13 gezeigt, ist die Expression Treg-spezifischer Gene wie CD25, Nrp1, CTLA-4 und Gpr83 in CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ im Vergleich zu CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen erhöht.

A



B

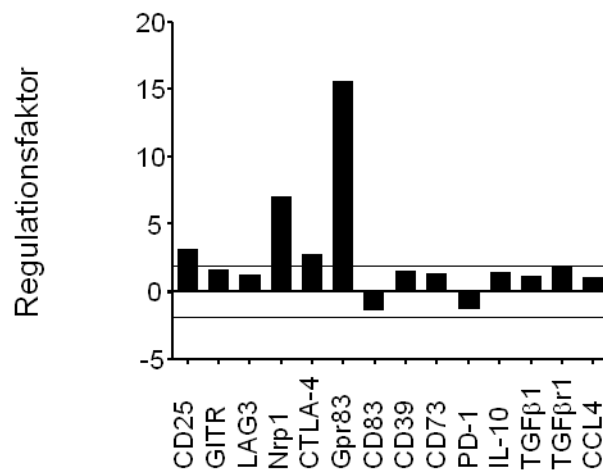


Abb. 3-13: Expression von Treg-spezifischen Molekülen in TGF-β/RA-behandelten CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen. TGF-β/RA-behandelte CD8⁺ T-Zellen wurden in CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch sortiert und Transkriptomanalysen wurden mittels der „Agilent gene expression chip“-Technologie durchgeführt. Die Relative Expression (A) und der Regulationsfaktor (B) von CD4⁺ Treg-spezifischen Genen von CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ gegenüber CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen sind dargestellt in Form von Diagrammen.

Für die Validierung der Überexpression einzelner Gene auf Proteinebene wurde die Überexpression der Treg-spezifischen Moleküle CD25 und CTLA-4 in den CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen gegenüber CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen im Durchflusszytometer bestätigt (Abb. 3-14).

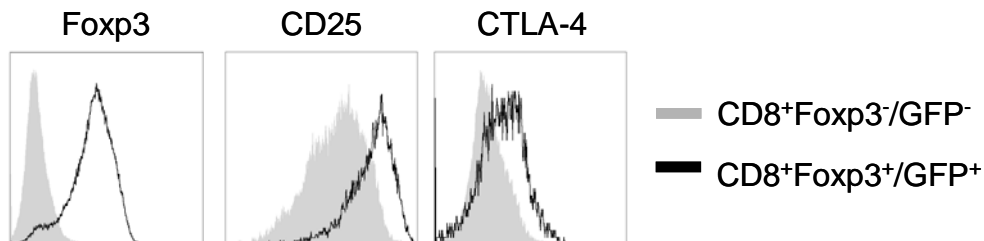


Abb. 3-14: Expression von Treg-spezifischen Molekülen in TGF- β /RA-behandelten CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen. 2×10^6 CD8⁺CD25⁻ T-Zellen aus Foxp3/GFP transgenen Mäusen wurden mit 4×10^5 DCs aus der Milz von BALB/c Mäusen kultiviert und mit 0.5 μ g/ml anti-CD3 in Anwesenheit von 2 ng/ml TGF- β und 100 nM RA polykonal stimuliert. Am Tag vier wurden die Zellen bezüglich der Expression von CD8, Foxp3/GFP und der angegebenen Moleküle Foxp3, CD25 und CTLA-4 durchflusszytometrisch analysiert. Die Expression des jeweils angegebenen Proteins in CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen im direkten Vergleich zu CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen ist in Form eines überlagerten Histogramms dargestellt. Ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

3.2.4.3 Expression von zytotoxischen CD8⁺ Effektormolekülen

Aktivierte CD8⁺ T-Zellen differenzieren überwiegend zu zytotoxischen CD8⁺ Effektor T-Zellen. Die Transkriptomergebinde zeigen bezüglich der Expression von zytotoxischen CD8⁺ T-Zell-spezifischen Genen eine erhöhte Expression von GzmB, GzmD und Prf1 in TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen (Abb. 3-15).

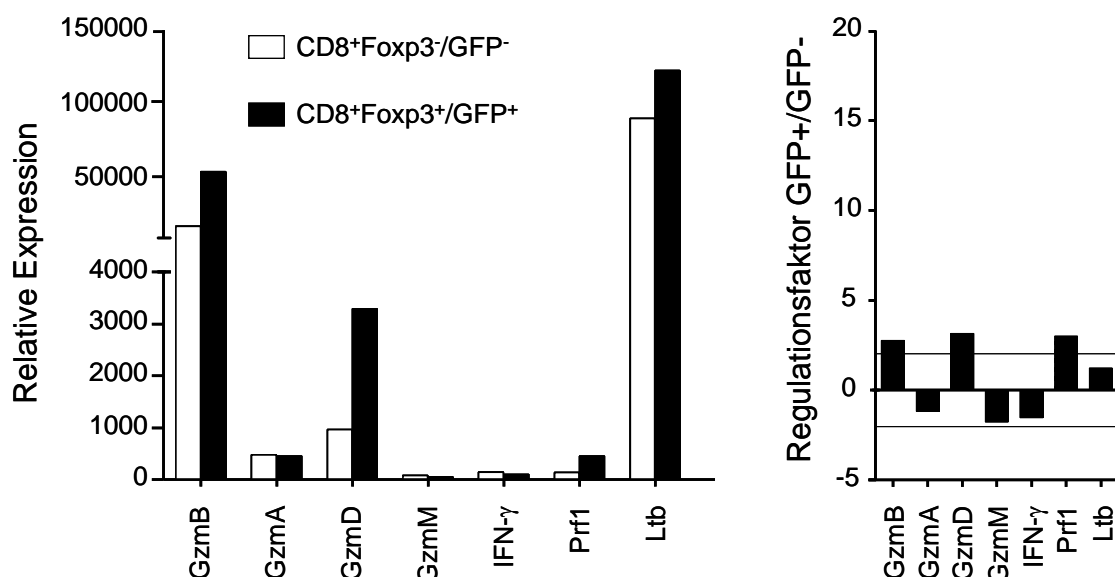


Abb. 3-15: Expression von zytotoxischen CD8⁺ T-Zell-spezifischen Genen in TGF-β/RA-behandelten CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen. TGF-β/RA-behandelte CD8⁺ T-Zellen wurden in CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch sortiert und Transkriptomanalysen wurden mittels der „Agilent gene expression chip“-Technologie durchgeführt. Die Relative Expression und der Regulationsfaktor von zytotoxischen CD8⁺ T-Zell-spezifischen Genen von CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ gegenüber CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen sind dargestellt in Form von Diagrammen.

Die 3fache Überexpression des zytotoxischen Enzyms GzmB in CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen gegenüber CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen wurde durch eine weitere Methode, der quantitativen Real-Time RT PCR, bestätigt (Abbildung 3-16).

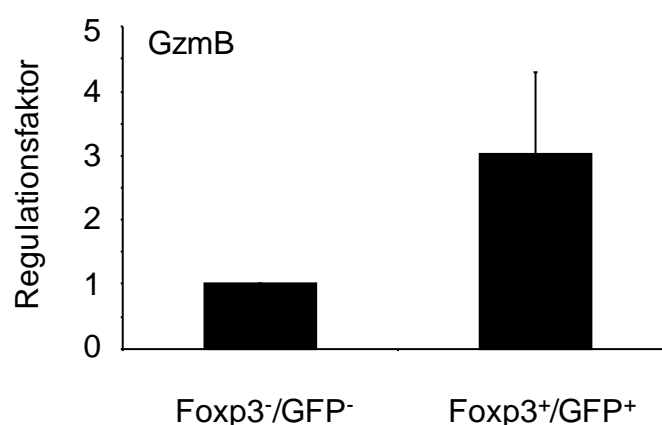


Abb. 3-16: Expression von GzmB in TGF-β/RA-behandelten CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen. TGF-β/RA-behandelte CD8⁺ T-Zellen wurden in CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch sortiert. Anschließend wurde die mRNA isoliert, in cDNA transkribiert und die Expression von GzmB mittels Real-Time PCR quantitativ bestimmt. Ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

3.2.4.4 Induktion von Darm-spezifischen Migrationsmolekülen

Verschiedene Studien haben die RA-vermittelte Induktion der Darm-spezifischen Migrationsmoleküle $\alpha_4\beta_7$, CCR9 und CD103 auf CD4⁺ T-Zellen gezeigt (Benson *et al.*, 2007; Coombes *et al.*, 2007). Die Transkriptomergebnisse dieser Migrationsmoleküle zeigen eine starke Expression von Integrin β_7 , CCR9 und CD103 sowohl in TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ als auch in CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen, wohingegen Integrin α_4 in beiden Zellpopulationen gering exprimiert wird (Abb. 3-17).

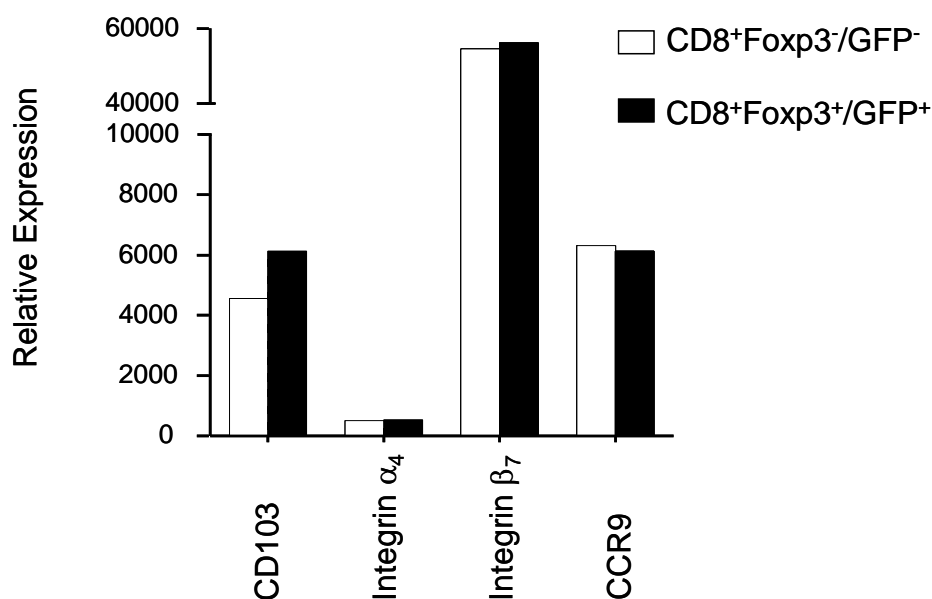


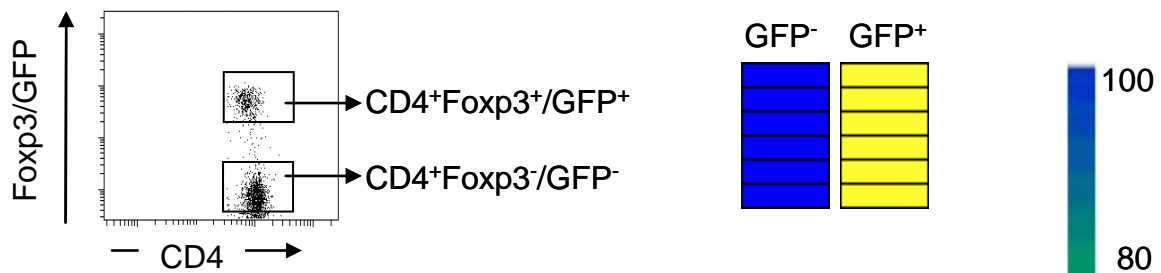
Abb. 3-17: Expression von Darm-spezifischen Migrationsmolekülen in TGF- β /RA-behandelten CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen. TGF- β /RA-behandelte CD8⁺ T-Zellen wurden in CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch sortiert und Transkriptomanalysen wurden mittels der „Agilent gene expression chip“-Technologie durchgeführt. Die Relative Expression von darmspezifischen Migrationsmolekülen in CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ gegenüber CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen ist dargestellt in Form eines Diagramms.

3.2.4.5 Methylierungsanalyse von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen

Epigenetische Mechanismen, wie die DNA-Methylierung, beeinflussen die Aktivität von Genen. Thymus-gereifte nTregs sind durch die stabile Expression von Foxp3 gekennzeichnet. Die stabile Expression von Foxp3 korreliert mit der vollständigen Demethylierung der CpG-Motive in der untersuchten Region des *foxp3* Promotors (Floess *et al.*, 2007). Bei TGF- β induzierten CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen sind diese CpG-

Motive nur teilweise demethyliert (Floess *et al.*, 2007). Um Hinweise über die Stabilität der Foxp3-Expression in TGF- β und TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ im Vergleich zu CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen zu erhalten, wurde das Methylierungsmuster der CpG-Motive einer ausgewählten Region des *foxp3* Promotors analysiert. Als Positivkontrolle wurden CD4⁺Foxp3⁺ nTregs in die Analyse mit einbezogen.

A



B

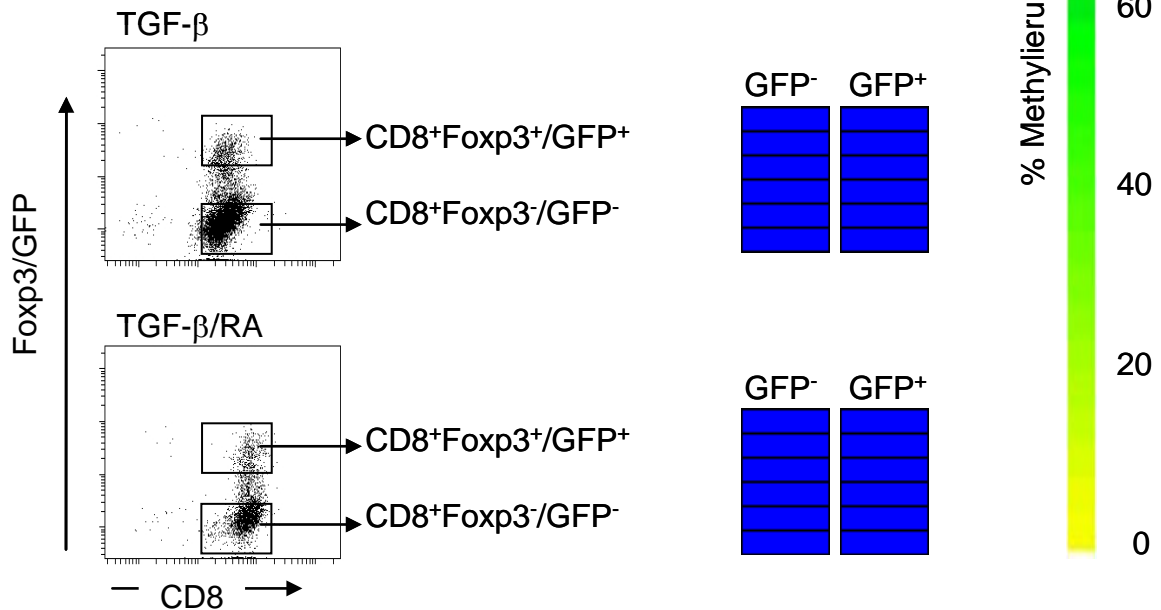


Abb. 3-18: Methylierungsanalyse einer ausgewählten Region des *foxp3* Promotors von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen. 1×10^6 TGF- β - und TGF- β /RA-behandelte CD8⁺ Zellen sowie natürliche CD4⁺ T-Zellen aus der Milz und den MLN von männlichen Foxp3/GFP transgenen Mäusen wurden in Foxp3⁻/GFP⁻ und Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch sortiert. Anschließend wurde die DNA isoliert und mit Bisulfid behandelt. Die ausgewählte Region des *foxp3* Promotors wurde mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Jede horizontale Linie stellt ein CpG-Motiv dar. Der Methylierungszustand jedes einzelnen CpG-Motivs ist entsprechend des Farbindex angegeben. Der Farbindex reicht von gelb (0 % Methylierung) bis blau (100 % Methylierung). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten.

Entsprechend der Literatur sind bei den CD4⁺Foxp3⁺/GFP⁺ nTregs alle sechs CpG-Motive in der ausgewählten Region des *foxp3* Promotors vollständig demethyliert. Im Gegensatz dazu ist diese Region des *foxp3* Promotors sowohl in TGF- β - als auch TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen vollständig methyliert (Abb. 3-18). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei TGF-/RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen um eine transiente Expression von Foxp3 handelt.

3.2.4.6 Zytokinprofil von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen

Um die Expression und Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Moleküle zu untersuchen, wurden durchflusszytometrisch sortierte CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen mit PMA/Ionomycin/Brefeldin A restimuliert und die Expression von intrazellulärem IFN- γ und IL-10 durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3-19A). Für die Bestimmung sezernierter Zytokine wurden die Zellen mit PMA/Ionomycin restimuliert und die angegebenen Zytokine in den Zellkulturüberständen unter Anwendung der Luminex-Technologie bestimmt (Abb. 3-19B). Diese Ergebnisse zeigen, dass TGF- β /RA-induzierte CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen nach Restimulierung deutlich weniger pro-inflammatorisches IFN- γ und TNF- α im Vergleich zu CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen exprimieren und sezernieren. In beiden Populationen wurde kein sezerniertes IL-10, IL-17, IL-23 und IL-4 detektiert.

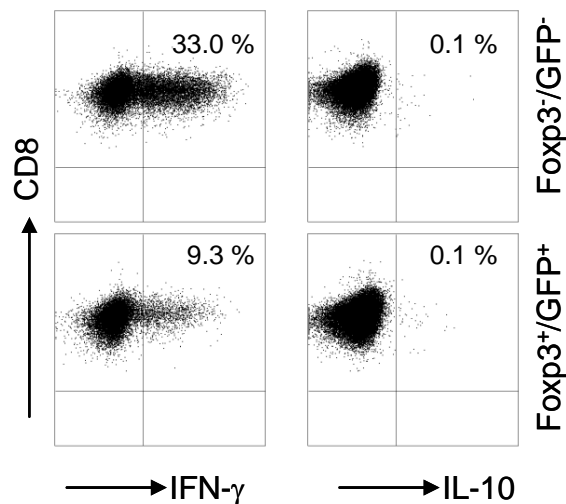
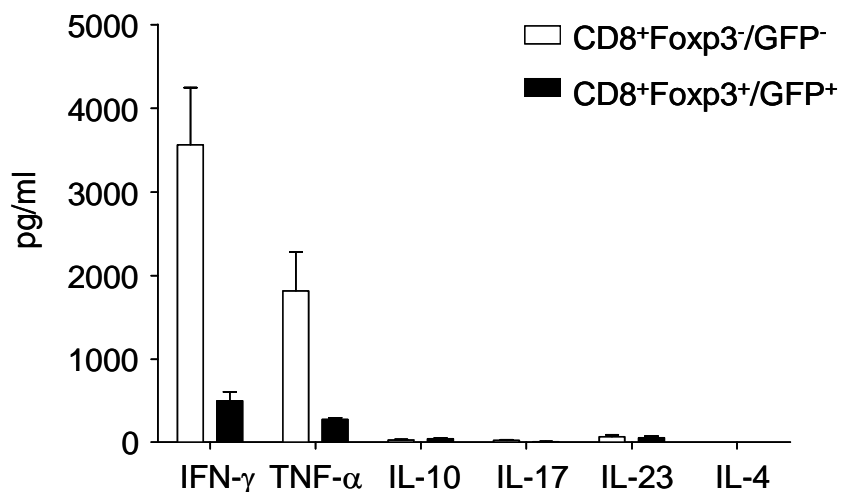
A**B**

Abb. 3-19: Zytokinprofil von TGF-β/RA-behandelten CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen. TGF-β/RA-behandelte CD8⁺ T-Zellen wurden in CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch sortiert und 20 Stunden mit 10 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin restimuliert. (A) Für die Messung intrazellulärer Zytokine wurde zusätzlich 5 µg/ml Brefeldin A hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen IFN-γ und IL-10 intrazellulär gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. (B) Für die Messung sezernierter Zytokine wurden die angegebenen Zytokine im Zellüberstand unter Anwendung des „Cytokine assay“ Kits im Luminex analysiert. Ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Ein weiteres Charakteristikum von nTregs ist Anergie nach *in vitro* Stimulierung. Anergie Zellen können unter normalen Umständen nicht wieder reaktiviert werden. Um zu untersuchen, ob TGF-β/RA-induzierte CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen anerg sind, wurde deren Proliferation nach Restimulierung gemessen. Durchflusszytometrisch

sortierte $CD8^+Foxp3^-/GFP^-$ und $CD8^+Foxp3^+/GFP^+$ T-Zellen wurden mit CFSE markiert und mit anti-CD3 *in vitro* restimuliert. Nach 3 Tagen wurde die Proliferation von $CD8^+Foxp3^-/GFP^-$ und $CD8^+Foxp3^+/GFP^+$ T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes im Durchflusszytometer gemessen. In Abb. 3-20 kann deutlich gezeigt werden, dass TGF- β /RA-induzierte $CD8^+Foxp3^+/GFP^+$ T-Zellen nach Restimulierung proliferieren und nicht anerg sind.

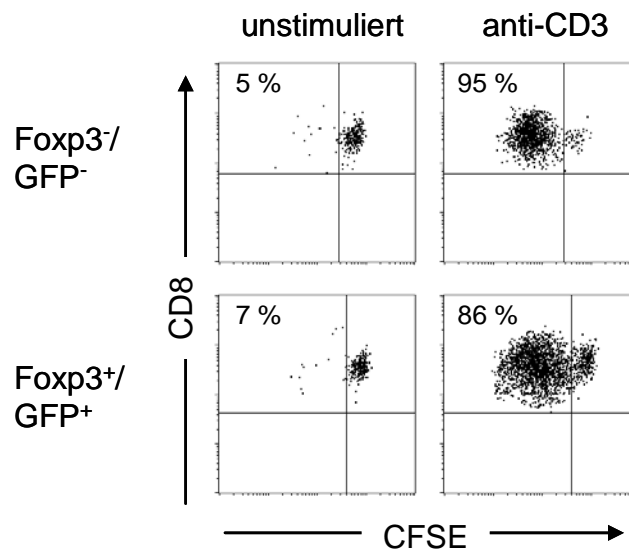


Abb. 3-20: Proliferation von TGF- β /RA-behandelten $CD8^+Foxp3^-/GFP^-$ und $CD8^+Foxp3^+/GFP^+$ T-Zellen. 2×10^5 durchflusszytometrisch sortierte TGF- β /RA-behandelte $CD8^+Foxp3^-/GFP^-$ und $CD8^+Foxp3^+/GFP^+$ T-Zellen wurden mit CFSE markiert und mit 0.5×10^5 DCs aus der Milz von BALB/c Mäusen und $0.5 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3 restimuliert. Nach 3 Tagen wurde die Proliferation anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes durchflusszytometrisch bestimmt. Ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

3.2.4.7 Immunsuppressives Potential von TGF- β /RA-induzierten $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen *in vitro* und *in vivo*

Um das immunsuppressive Potential von TGF- β /RA-induzierten $CD8^+Foxp3^+/GFP^+$ T-Zellen zu bestimmen, wurde ein *in vitro* Inhibitionstest mit polyklonalen $CD4^+$ oder $CD8^+$ Reporter T-Zellen durchgeführt. TGF- β /RA-behandelte $CD8^+Foxp3^+/GFP^+$ und $CD8^+Foxp3^-/GFP^-$ T-Zellen wurden mit CFSE-markierten $CD4^+CD25^-$ oder $CD8^+CD25^-$ T-Zellen und DCs ko-kultiviert und mit anti-CD3 Antikörper stimuliert. Nach drei Tagen wurde die Proliferation von CFSE-markierten $CD4^+CD25^-$ und $CD8^+CD25^-$ Reporter T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes im Durchflusszytometer gemessen.

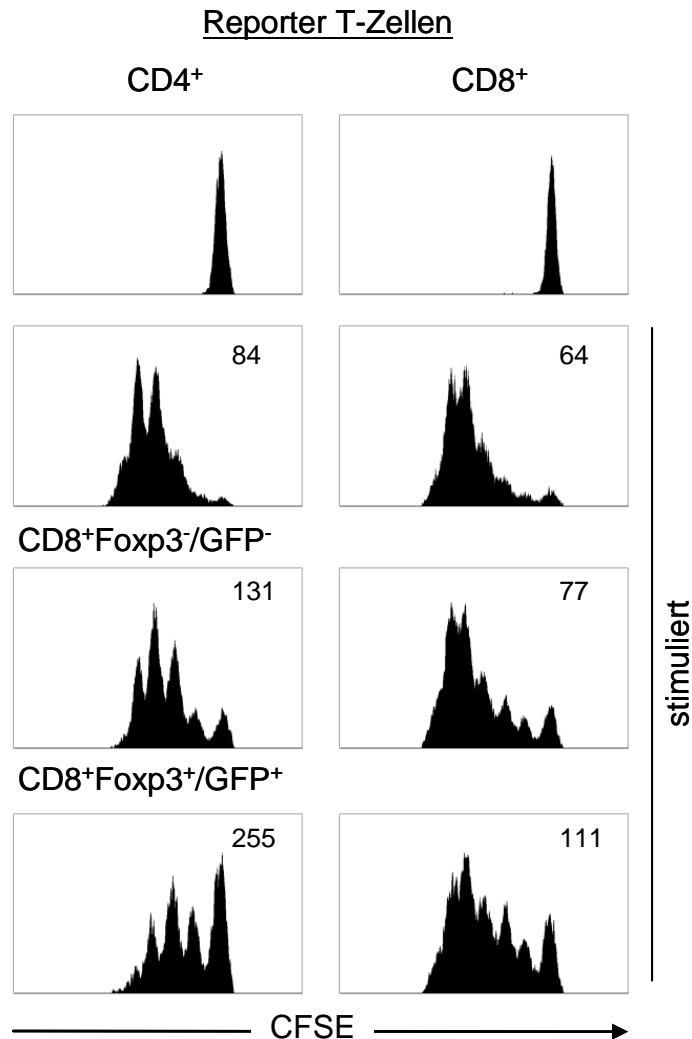


Abb. 3-21: Immunsuppressives Potential von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen *in vitro*. Durchflusszytometrisch sortierte TGF- β /RA-behandelte CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen wurden mit 1×10^5 naiven CFSE-markierten CD4⁺CD25⁻ oder CD8⁺CD25⁻ congenen Reporter T-Zellen und 5×10^4 DCs aus der Milz von BALB/c Mäusen im Verhältnis 1:1 ko-kultiviert und mit 0.5 μ g/ml löslichem anti-CD3 Antikörper aktiviert. Die Histogramme zeigen die Proliferation von CFSE-markierten CD4⁺CD25⁻ oder CD8⁺CD25⁻ Reporter T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes nach drei Tagen Kultivierung. Der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität des CFSE-Farbstoffes ist angegeben. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse des Inhibitionstests zeigen deutlich, dass TGF- β /RA-induzierte CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen die Proliferation von CD4⁺ Reporter T-Zellen inhibieren können. Im Gegensatz dazu ist der supprimierende Effekt dieser CD8⁺ Tregs gegenüber der Proliferation von CD8⁺ T-Zellen nur gering (Abb. 3-21).

Es wurde untersucht, ob die inhibitorische Wirkung von CD8⁺ Tregs gegenüber CD4⁺ T-Zellen über lösliche Mediatoren erfolgt oder Zell-Zell-Kontakt-abhängig ist.

Hierfür wurde ein Inhibitionstest mit CD4⁺CD25⁻ Reporter T-Zellen analog zu Abb. 3-21 im Transwell-System durchgeführt. Durch dieses System sind die Zellpopulationen durch eine semipermeable Membran physikalisch voneinander getrennt. Dadurch ist der Austausch von löslichen Mediatoren möglich, der direkte Kontakt zwischen Zellpopulationen wird unterbunden.

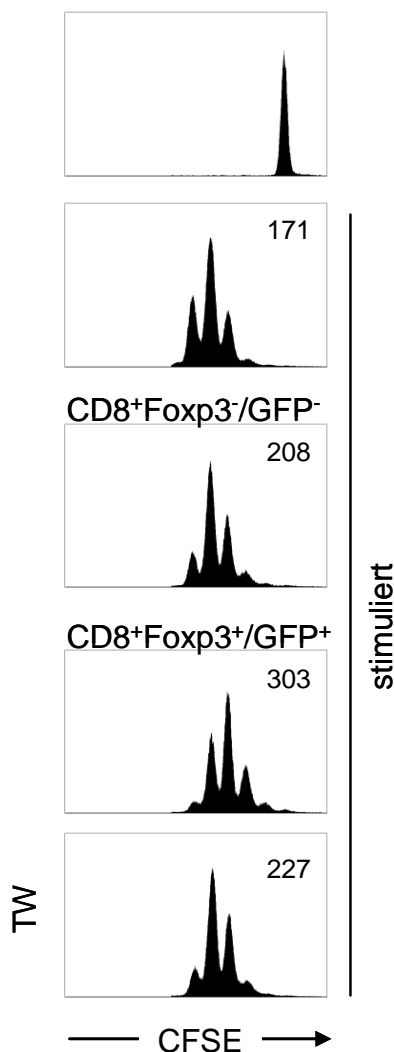


Abb. 3-22: Zell-Zell-Kontakt-vermitteltes immunsuppressives Potential von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen *in vitro*. Durchflusszytometrisch sortierte TGF- β /RA-behandelte CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁻ und CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen wurden mit 1×10^5 naiven CFSE-markierten CD4⁺CD25⁻ Reporter T-Zellen und 5×10^4 DCs aus der Milz von BALB/c Mäusen im Verhältnis 1:1 ko-kultiviert und mit 0.5 μ g/ml löslichem anti-CD3 Antikörper polyklonal stimuliert. Im Transwell-System (TW) wurden CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen durch eine semipermeable Membran von CD4⁺ Reporter T-Zellen getrennt. Die Histogramme zeigen die Proliferation von CFSE-markierten CD4⁺CD25⁻ Reporter T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes nach drei Tagen Kultivierung. Der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität des CFSE-Farbstoffes ist angegeben. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von vier unabhängigen Experimenten.

Die inhibitorische Wirkung von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen ist im Transwell-System aufgehoben (Abb. 3-22). Dies verdeutlicht, dass TGF- β /RA-induzierte CD8⁺ Tregs für die Ausübung ihrer regulatorischen Funktion im direkten Zell-Zell-Kontakt mit den zu inhibierenden CD4⁺ T-Zellen stehen müssen.

Die Abbildungen 3-21 und 3-22 zeigen das suppressive Potential von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen gegenüber CD4⁺ T-Zellen *in vitro*. Es ist aber bekannt, dass bei *in vitro* Systemen die Komplexität von systemischen und organspezifischen Einflüssen nicht erfassbar ist. Für die biologische Relevanz von Tregs ist deren regulatorische Funktion in einem komplexen *in vivo* System von entscheidender Bedeutung. Daher wurde die immunregulatorische Kapazität von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ Tregs *in vivo* im Kontakthyper-sensibilitätsmodell, einem Entzündungsmodell der Haut, untersucht. Hierbei wurde in sensibilisierten BALB/c Mäusen eine T-Zell-abhängige Entzündungsreaktion durch die lokale Reaktivierung von T-Effektorzellen gegenüber dem Hapten DNFB ausgelöst. Die Sensibilisierung der Tiere gegenüber DNFB erfolgte durch das Auftragen einer Öl/DNFB-Emulsion auf die Rückenhaut an Tag 0. Die lokale Reaktivierung DNFB-spezifischer T-Zellen in sensibilisierten Mäusen wurde an Tag 5 am rechten Ohr durchgeführt. Im Verlauf von 36 Stunden nach Reaktivierung entwickelte sich eine akute Entzündungsreaktion im rechten Ohr DNFB-behandelter Mäuse, die anhand der Stärke der Schwellung am rechten Ohr quantifiziert wurde (Positivkontrolle, Pos. Ktrl.). Um zu untersuchen, ob TGF- β /RA-induzierte CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ Tregs das Potential besitzen, die akute Phase der Entzündungsreaktion zu inhibieren, wurden an Tag 4, 24 Stunden vor der lokalen Reaktivierung am rechten Ohr, sortierte TGF- β /RA-behandelte CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ oder CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁻ T-Zellen in DNFB-sensibilisierte BALB/c Mäuse intravenös injiziert. Bei der Negativkontrolle (Neg. Ktrl.) erfolgte die lokale Reaktivierung in nicht-sensibilisierten BALB/c Mäusen (Abb. 3-23).

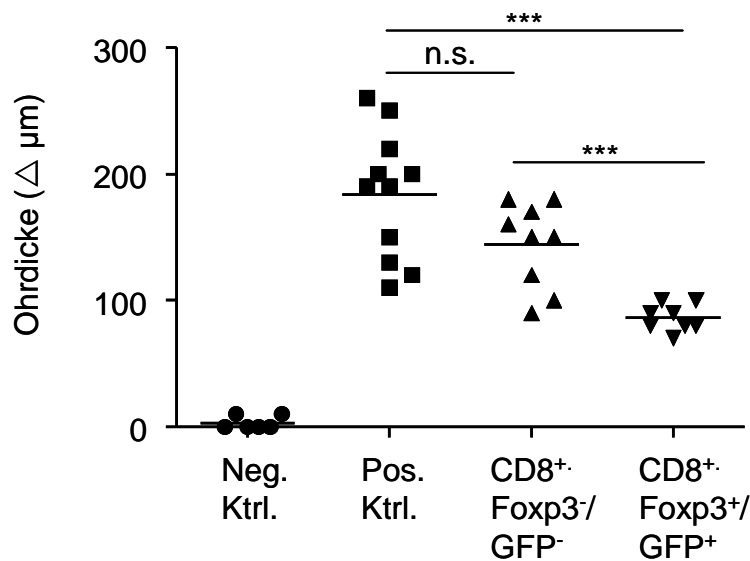


Abb. 3-23: Immunsuppressives Potential von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen im Kontakthypersensibilitätsmodell. BALB/c Mäuse wurden an Tag 0 gegenüber DNFB sensibilisiert. An Tag 5 erfolgte die lokale Reaktivierung DNFB-spezifischer T-Zellen am rechten Ohr. 36 Stunden nach Reaktivierung wurde die allergische Reaktion anhand der Stärke der Ohrschwellung bestimmt (Pos. Ktrl.). Bei der Negativkontrolle (Neg. Ktrl.) erfolgte die Reaktivierung in nicht-sensibilisierten BALB/c Mäusen. Für die Bestimmung des immunsuppressiven Potentials von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen im Kontakthypersensibilitätsmodell wurden 2.5×10^6 durchflusszytometrisch sortierte TGF β /RA-behandelte CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ oder CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen 24 Stunden vor Reaktivierung i.v. in sensibilisierte BALB/c Mäuse injiziert. Dargestellt sind die Datenpunkte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels des Student's *t* test berechnet (***) $p < 0.001$; n.s., nicht signifikant).

Wie erwartet, konnte bei den Mäusen der Negativ-Kontroll-Gruppe keine Schwellung des rechten Ohrs und somit keine allergische Reaktion festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse der Positiv-Kontroll-Gruppe, denen nach Sensibilisierung keine CD8⁺ T-Zellen i.v. injiziert wurden, eine normale DNFB-induzierte allergische Reaktion, die zur Schwellung des rechten Ohrs um durchschnittlich 180 μm führte. Interessanterweise war die Schwellung des rechten Ohrs bei den Mäusen, denen CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ T-Zellen i.v. injiziert wurden, signifikant reduziert im Vergleich zu der Positiv-Kontroll-Gruppe. Dem gegenüber hatte der adoptive Transfer von CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen keinen signifikanten inhibierenden Einfluss auf die Entwicklung der DNFB-induzierten allergischen Reaktion. Die Inhibitionstests zeigen das hohe immunsuppressive Potential von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ regulatorischen T-Zellen *in vitro* und *in vivo*.

3.2.5 Regulatorische CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen im Humansystem

In der Einleitung ist beschrieben, dass CD4⁺ Tregs für die Aufrechterhaltung intestinaler Homöostase von enormer Bedeutung sind. Welche Rolle CD8⁺Foxp3⁺ Tregs im Zusammenhang mit Darmentzündungen spielen, ist bisher weniger bekannt.

3.2.5.1 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen bei CEDE

Es wurde untersucht, ob und inwieweit ein Zusammenhang zwischen einer Darmentzündung und dem Anteil CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen besteht. Hierfür wurden PBMC von gesunden Spendern und Kolitis ulzerosa Patienten isoliert und der prozentuale Anteil CD25⁺ T-Zellen innerhalb von CD8⁺ T-Zell- sowie Foxp3⁺ T-Zellen innerhalb der CD8⁺CD25⁺ T-Zellpopulation durchflusszytometrisch bestimmt

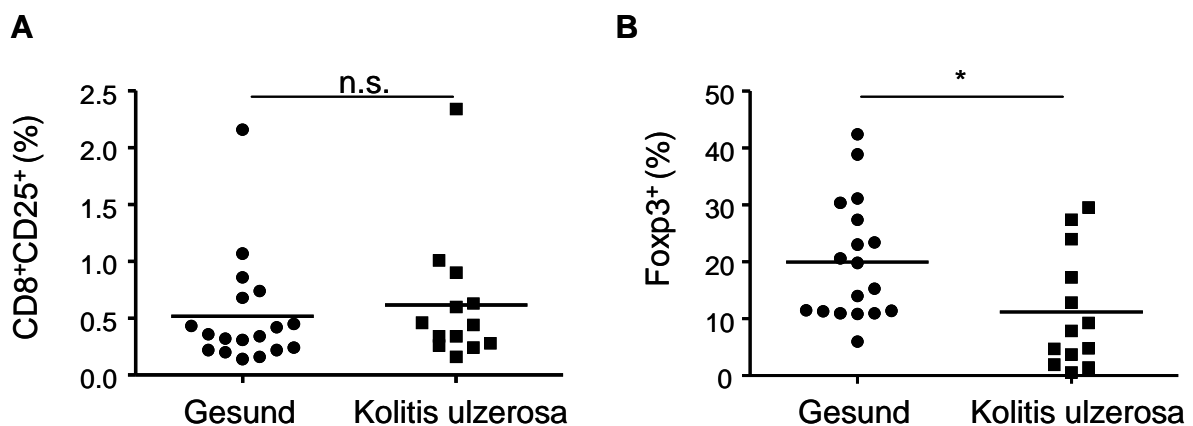


Abb. 3-24: CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen im peripheren Blut von Kolitis ulzerosa Patienten. PBMC von gesunden Spendern (n=18) und Kolitis ulzerosa Patienten (n=13) wurden mit Antikörpern gegen CD8, CD25 und intrazellulärem Foxp3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Prozentualer Anteil CD8⁺CD25⁺ T-Zellen innerhalb der CD8⁺ T-Zellpopulation. (B) Prozentualer Anteil Foxp3⁺ T-Zellen innerhalb der CD8⁺CD25⁺ T-Zellpopulation. Dargestellt sind die Datenpunkte und Mittelwerte. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels des Student's *t* test berechnet (* *p*>0.05; n.s., nicht signifikant).

Trotz des Entzündungszustandes gibt es keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil CD25⁺ T-Zellen innerhalb der CD8⁺ T-Zellpopulation zwischen gesunden Spendern und Kolitis ulzerosa Patienten (Abb. 3-24A). Im Gegensatz dazu ist der Anteil Foxp3⁺ T-Zellen innerhalb der CD8⁺CD25⁺ T-Zellpopulation in Kolitis ulzerosa Patienten (11 %) im Mittel gegenüber gesunden Spendern (19 %) signifikant reduziert (Abb. 3-24B).

Der reduzierte Anteil $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen bei Kolitis ulcerosa Patienten deutet daraufhin, dass nicht nur $CD4^+$ Tregs, sondern auch $CD8^+Foxp3^+$ Tregs an der Kontrolle von überschießenden Immunantworten in der humanen intestinalen Mukosa beteiligt sind und Methoden zur Generierung von $CD8^+Foxp3^+$ Tregs für die Therapie von Darmentzündungen wie Kolitis ulcerosa sinnvoll macht.

3.2.5.2 TGF- β /RA-vermittelte Induktion von humanen $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen *in vitro*

Um zu untersuchen, ob die Induktion von $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen auch im humanen System durch TGF- β und RA induziert werden kann, wurden humane naive $CD8^+$ T-Zellen aus dem peripheren Blut isoliert, mit CFSE-markiert und in Anwesenheit von TGF- β und RA allein oder der Kombination aus TGF- β und RA mit löslichem anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern stimuliert. Nach vier Tagen wurde der Anteil $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen in proliferierenden $CD8^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

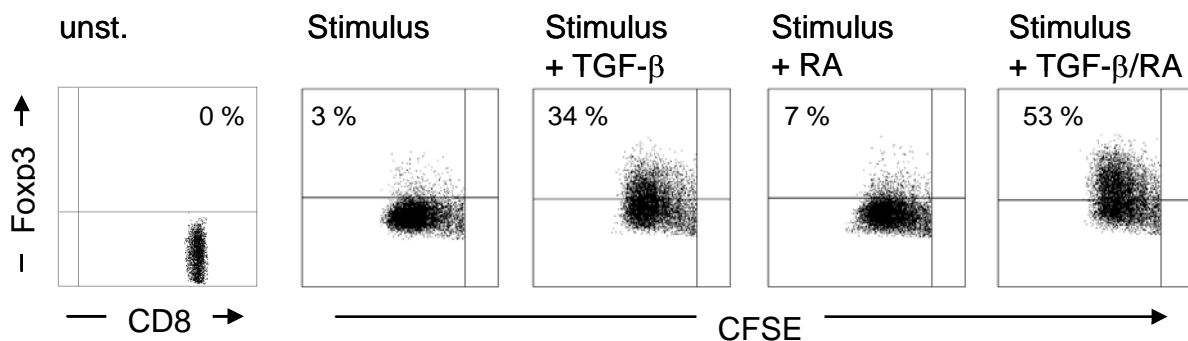


Abb. 3-25: TGF- β /RA-vermittelte Induktion von humanen $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen *in vitro*. 1×10^5 $CD8^+$ T-Zellen wurden aus dem peripheren Blut isoliert, mit CFSE markiert und mit $0.5 \mu\text{g/ml}$ löslichem anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern kultiviert. Wenn angegeben wurden 2 ng/ml humanes rTGF- β oder 100 nM RA hinzugegeben. Nach vier Tagen wurden die Zellen bezüglich der Expression von CD8 und intrazellulärem Foxp3 gefärbt. Die Proliferation von $CD8^+$ T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes bestimmt. Die „dot plots“ zeigen die Expression von Foxp3 in den proliferierenden $CD8^+$ T-Zellen. Ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Die Stimulierung von humanen $CD8^+$ T-Zellen allein oder in Kombination mit RA führt lediglich zu einem leichten Anstieg der Foxp3 Expression (3 %; 7 %). Im Gegensatz dazu führt die Stimulierung in Anwesenheit von TGF- β zur stärkeren Foxp3 Expression in $CD8^+$ T-Zellen (34 %). Analog zur TGF- β /RA-induzierten Expression von Foxp3 in murinen $CD8^+$ T-Zellen, wird die TGF- β vermittelte Induktion von Foxp3

in humanen $CD8^+$ T-Zellen durch die Anwesenheit von RA massiv verstärkt (53 %) (Abb. 3-25).

Im Gegensatz zum Maussystem ist die Expression von Foxp3 in humanen T-Zellen kein eindeutiger Marker für regulatorische T-Zellen, da Foxp3 auch in aktivierten humanen Effektorzellen transient exprimiert wird. Daher wurde der Phänotyp von humanen TGF- β /RA-induzierten $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen hinsichtlich der Expression von weiteren Treg-spezifischen Markern näher charakterisiert. Die Expression von Foxp3, CD25 und CTLA-4 wurde in TGF- β /RA-behandelten und unbehandelten $CD8^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

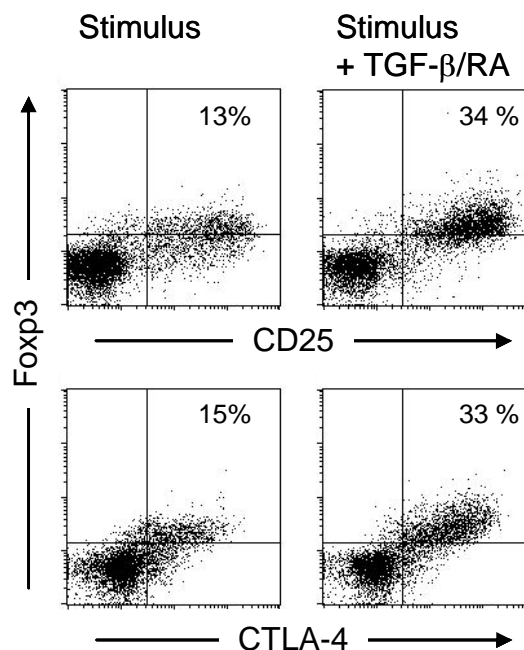


Abb. 3-26: Expression von Treg-spezifischen Markermolekülen in TGF- β /RA-induzierten humanen $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen. 1×10^5 $CD8^+$ T-Zellen wurden aus dem peripheren Blut isoliert und in An- oder Abwesenheit von 2 ng/ml humanes rTGF- β oder 100 nM RA mit 0.5 μ g/ml löslichem anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern aktiviert. Nach vier Tagen wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD8, intrazellulärem Foxp3 und CD25 oder CTLA-4 gefärbt. Die „dot plots“ zeigen die Expression von Foxp3 und CD25 oder Foxp3 und CTLA-4 in $CD8^+$ T-Zellen. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Wie in Abb. 3-26 dargestellt, zeigen TGF- β /RA-behandelte humane $CD8^+Foxp3^+$ T-Zellen eine stark erhöhte Expression der $CD4^+$ Treg-spezifischen Markermoleküle CD25 und CTLA-4.

3.2.5.3 Immunsuppressives Potential von TGF- β /RA-induzierten humanen CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen *in vitro*

Um festzustellen, ob humane TGF- β /RA-induzierte CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen neben der Expression Treg-spezifischer Markermoleküle suppressives Potential aufweisen, wurden CD8⁺CD25⁺ T-Zellen nach Aktivierung in Anwesenheit von TGF- β /RA durchflusszytometrisch sortiert und mit naiven CFSE-markierten CD4⁺ Reporter T-Zellen ko-kultiviert. Die Ko-Kultur wurde unter Anwendung des „*Treg Suppression Inspector*“ polykonal stimuliert. Nach sechs Tagen wurde die Proliferation der Reporter T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes im Durchflusszytometer bestimmt (Abb. 3-27).

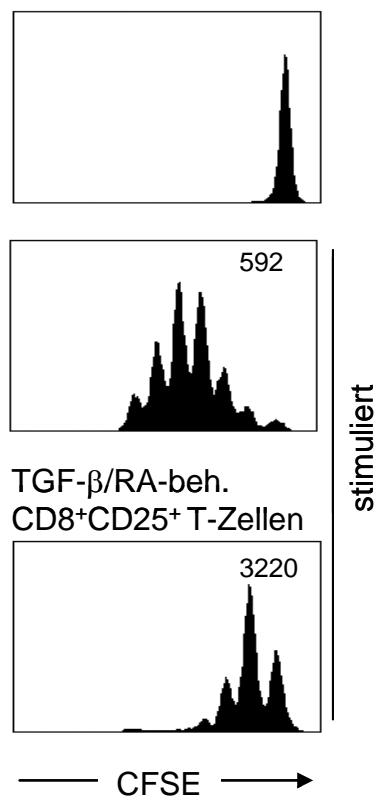


Abb. 3-27: Immunsuppressives Potential von TGF- β /RA-induzierten humanen CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen *in vitro*. Humane TGF- β /RA-behandelte CD8⁺CD25⁺ T-Zellen wurden durchflusszytometrisch sortiert, mit naiven CFSE-markierten autologen CD4⁺ Reporter T-Zellen im Verhältnis 1:1 ko-kultiviert und mit dem „*Treg Suppression Inspector*“ polykonal stimuliert. Die Histogramme zeigen die Proliferation von CFSE-markierten CD4⁺ Reporter T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Farbstoffes nach sechs Tagen Kultivierung. Der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität des CFSE-Farbstoffes ist angegeben. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

Humane TGF- β /RA-induzierte CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen besitzen die Fähigkeit die Proliferation von autologen CD4⁺ Reporter T-Zellen *in vitro* zu unterdrücken. Das verdeutlicht das hohe immunsuppressive Potential dieser CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen.

Tregs spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Immunreaktionen in der intestinalen Mukosa und sind für die Aufrechterhaltung intestinaler Homöostase essentiell. Die Untersuchungen im VILLIN-HA transgenen Mausmodell zeigen, dass Darm-spezifische CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen in den Strukturen des GALT induziert werden. Die Aktivierung naiver CD8⁺Foxp3⁻ T-Zellen in Anwesenheit Darm-relevanter Mediatoren wie TGF- β und RA ist ein möglicher Mechanismus zur Induktion von murinen und humanen CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen. Diese CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen zeigen eine erhöhte Expression der Treg-spezifischen Markermoleküle CD25 und CTLA-4 und verfügen über ein hohes immunsuppressives Potential. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Anteil CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen bei Kolitis ulzerosa Patienten reduziert ist. Dies deutet daraufhin, dass nicht nur CD4⁺ Tregs, sondern auch CD8⁺Foxp3⁺ Tregs an der Kontrolle von überschießenden Immunantworten in der humanen intestinalen Mukosa beteiligt sind und die Generierung von CD8⁺Foxp3⁺ Tregs für die Therapie von Darmentzündungen wie Kolitis ulzerosa sinnvoll macht.

DISKUSSION

4 Diskussion

Das intestinale Immunsystem stellt den größten und komplexesten Teil des menschlichen Immunsystems dar. In den letzten Jahren wurde durch intensive Forschungsbemühungen ein komplexes Bild der Strukturen und Aufgaben des intestinalen Immunsystems und der Interaktion mit anderen immunologischen Kompartimenten erstellt, viele Fragen sind dennoch offen. Bis heute ist nicht vollständig geklärt in welchen intestinalen Kompartimenten die Induktion von T-Zell-Antworten stattfindet. Zusätzlich werden immer neue T-Zell-Subpopulationen im intestinalen Immunsystem identifiziert, die phänotypisch und funktionell noch nicht charakterisiert sind.

4.1 Aktivierung Darmantigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der intestinalen Mukosa

Für die Therapie von Autoimmunerkrankungen des Darms ist eine gezielte Modulation von Immunreaktionen in der intestinalen Mukosa notwendig. Dies erfordert ein umfassendes Wissen über den Induktionsort der Immunantworten und die an der Immunantwort beteiligten Zellen. Grundvoraussetzung für die Induktion einer Immunantwort gegenüber einem Antigen ist die Aufnahme des Antigens durch APCs und der anschließende direkte Zellkontakt mit einer Antigen-spezifischen T-Zelle. Die Wahrscheinlichkeit eines Aufeinandertreffens dieser Zelltypen wird durch den Transport dieser Zellen über afferente Lymphe in das organisierte lymphatische Gewebe des nächstgelegenen Lymphknotens erhöht – ein Vorgang, der für die effektive Immunreaktion von zentraler Bedeutung ist. Als Induktionsorte für intestinale Immunreaktionen werden hauptsächlich die MLN, aber auch die PP und ILFs, diskutiert (reviewed in Izcue *et al.*, 2006; Izcue *et al.*, 2009). Es wurde gezeigt, dass Dendritische Zellen lumenale Antigene sowie apoptotische intestinale Epithelzellen in der LP aufnehmen und in die MLN transportieren. Dort werden diese Antigene Antigen-spezifischen Lymphozyten präsentiert (Huang *et al.*, 2000). Diese These wird durch Untersuchungen in dieser Arbeit untermauert. Während DCs aus den MLN von VILLIN-HA transgenen Mäusen Darmantigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen stimulieren, sind DCs aus der Milz dazu nicht in der Lage. Diese Ergebnisse

verdeutlichen, dass die Präsentation epithelialer Antigene auf das Darm-assoziierte Gewebe beschränkt ist. Dabei scheint die Aktivierung von HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen größtenteils in den MLN stattzufinden. Dies steht im Einklang mit verschiedenen Studien, die die essentielle Rolle der MLN bei der Initiierung von Immunantworten gegenüber intestinalen Antigenen zeigen (Voedisch *et al.*, 2009; Macpherson *et al.*, 2004). Es konnte in dieser Arbeit aber auch gezeigt werden, dass die operative Resektion der MLN die Initiierung einer zytotoxischen CD8⁺ T-Zell-Antwort nicht verhindert. Verschiedene Mechanismen können die Aktivierung von HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und die resultierende Entzündung des Dünndarms in MLN-defizienten VILLIN-HA transgenen Mäusen erklären. Beispielsweise wurde in Studien untersucht, ob die Milz beim Fehlen der MLN die Initiierung einer Immunantwort gegenüber Darmantigenen übernimmt, da die Milz in diesem Fall der nächstgelegene Ort für zirkulierende APCs oder lösliches Antigen ist (Hahn *et al.*, 2009; Macpherson *et al.*, 2004). Interessanterweise können Hahn und Kollegen zeigen, dass eine in MLN-defizienten Tieren induzierte Cholera Toxin-spezifische IgA-Antwort nicht auf Induktionsprozesse in der Milz zurückgeführt werden kann und somit die Milz die Rolle der MLN nicht übernimmt (Hahn *et al.*, 2009). Ein weiterer Aspekt, der gegen die Milz als Induktionsort einer CD8⁺ T-Zell-vermittelten Immunantwort in MLN-defizienten VILLIN-HA transgenen Mäusen spricht, ist die Tatsache, dass die anatomische Lokalisation der Aktivierung von T-Zellen das Spektrum von induzierten Migrationsmolekülen auf den aktivierten T-Zellen bestimmt. Die spezielle Kombination dieser Migrationsmoleküle bewirkt die zielgerichtete Migration von aktivierten T-Zellen in das Gewebe, das die entsprechenden Liganden exprimiert (Hammerschmidt *et al.*, 2008; Stenstad *et al.*, 2007; Austrup *et al.*, 1997; Johansson-Lindbom *et al.*, 2003). Die darmspezifischen Migrationsmoleküle CCR9 und $\alpha_4\beta_7$ werden selektiv auf T-Zellen exprimiert, die in den MLN oder PP aktiviert werden (Johansson-Lindbom *et al.*, 2003; Mora *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2002; Svensson *et al.*, 2002). Die Interaktion zwischen $\alpha_4\beta_7$ mit epithelialelem MADCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) und CCR9 mit dem von Dünndarmepithelzellen produzierten Chemokin CCL25 ist für die Migration von aktivierten CD8 $\alpha\beta$ T-Zellen in den Dünndarm notwendig (Lefrancois *et al.*, 1999; Stenstad *et al.*, 2006). Wird CCR9 nicht auf aktivierten CD8 $\alpha\beta$ T-Zellen exprimiert, sind diese bei der Einwanderung in die Epithelschicht des Dünndarms stark eingeschränkt (Stenstad *et al.*, 2007). *In vitro* wird gezeigt, dass spezielle DC-

Subpopulationen aus der LP, den PP oder den MLN die Expression von $\alpha_4\beta_7$ und CCR9 auf aktivierten T-Zellen induzieren (Mora *et al.*, 2003; Johansson-Lindbom *et al.*, 2003). Darüber hinaus weisen verschiedene Studien darauf hin, dass der induzierte Darmtropismus durch Lymphknoten-spezifische Faktoren wie beispielsweise Stromazellen herbeigeführt wird (Ahrendt *et al.*, 2008; Pabst *et al.*, 2009). Nur sehr wenige DCs präsentieren *in vivo* das gleiche Antigen innerhalb eines komplexen LNs und MLN DCs verlieren die Fähigkeit $\alpha_4\beta_7$ auf T-Zellen zu induzieren, wenn sie sich *in vivo* nicht mehr im Darmgewebe befinden (Dudda *et al.*, 2005). Dem entsprechend erlangen DCs aus der Milz oder dem Knochenmark die Fähigkeit zur Induktion von CCR9 und $\alpha_4\beta_7$ auf aktivierten T-Zellen, wenn sie in die afferente Lymphe der MLN injiziert werden (Hammerschmidt *et al.*, 2008). Daher ist die Milz als Ausweichorgan für die Aktivierung von darmmigrierenden Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus folgenden Gründen unwahrscheinlich: 1. DCs aus der Milz sind nicht in der Lage darmspezifische Migrationsmoleküle wie CCR9 und $\alpha_4\beta_7$ auf aktivierten T-Zellen zu induzieren, um deren Migration in den Darm herbeizuführen. 2. DCs, die aus der LP und den PP in die Milz migrieren, verlieren vermutlich beim Verlassen der darmspezifischen Umgebung die Fähigkeit zur Induktion von Darmtropismus. Da allerdings detaillierte Informationen über Veränderungen der Milz nach MLN Resektion fehlen, kann eine Beteiligung der Milz bei der CD8⁺ T-Zell-vermittelten Immunantwort in MLN-defizienten VILLIN-HA transgenen Mäusen zur Zeit nicht komplett ausgeschlossen werden.

Aufgrund der Tatsache, dass die Läsionen im Dünndarm nach adoptivem Transfer von naiven HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgenen Mäuse in den PP am stärksten ausgeprägt sind und die PP neben den MLN einen weiteren Ort zur Induktion von Immunantworten im GALT darstellen können, ist es denkbar, dass die MLN-Defizienz durch PP substituiert wird. Die Funktion von PP als Induktionsort für HA-spezifische CD8⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgenen Mäusen wird durch die Anwendung des Pharmakons FTY720, das die Auswanderung von Lymphozyten aus lymphoiden Organen wie den MLN und PP verhindert, bestätigt. Um die essentielle Rolle der PP bei der Substitution der MLN als Induktionsort eindeutig bestimmen zu können, ist die Untersuchung der Aktivierung HA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in PP- und MLN-defizienten VILLIN-HA transgenen Mäusen notwendig. PP-defiziente Mäuse können durch die Unterdrückung der Organogenese der PP generiert

werden. Dies erfolgt durch die Behandlung des trächtigen Muttertieres mit Lymphotoxin β Rezeptor (LT β R)-IgG Fusionsprotein während der Schwangerschaft und die weitere Behandlung der Jungtiere (Rennert *et al.*, 1998; Spahn *et al.*, 2006). Eine anschließende operative Resektion der MLN erlaubt Untersuchungen an Tieren, die weder PP ausbilden noch MLN besitzen. Die Durchführung der CD8⁺ T-Zell-vermittelten Entzündung des Dünndarms in diesen Tieren könnte weitere Informationen über die Funktion der einzelnen mukosalen Kompartimente geben.

Neben den PP und MLN als Induktionsorte für Immunantworten ist auch eine Aktivierung von naiven CD8⁺ T-Zellen in der LP von VILLIN-HA transgenen Mäusen denkbar. Die LP des Dünndarms beinhaltet eine Vielzahl von DCs, die in engem Kontakt mit intestinalen Antigenen stehen und auch in die Induktion von Immunantworten involviert sind. Intestinale Antigene werden entweder direkt von LP DCs in Darm-assoziierten lymphoiden Geweben präsentiert, oder zur Induktion der entsprechenden Immunantwort von migrierenden LP DCs in die MLN transportiert (Niess *et al.*, 2008; Niess *et al.*, 2005). LP DCs endozytieren oral verabreichtes Antigen und besitzen die Fähigkeit Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* zu stimulieren (Chirido *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist denkbar, dass das Modellantigen HA in VILLIN-HA transgenen Mäusen von LP DCs in die MLN transportiert wird und im Fall einer MLN-Defizienz HA-spezifische CD8⁺ T-Zellen durch HA-präsentierende LP DCs direkt in der LP aktiviert werden. Allerdings zeigen LP DCs aus VILLIN-HA transgenen Mäusen nicht die Fähigkeit naive HA-spezifische CD8⁺ T-Zellen *in vitro* zu stimulieren. Die Präsentation von exogenem Antigen über MHC-Klasse-I Moleküle zur Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen erfordert die Cross-Präsentation des Antigens. Nur spezialisierte DC-Populationen, beispielsweise CD8 α ⁻CD11b⁺ DCs in den MLN oder CD8 α ⁺ DCs in der Milz, verfügen über diese Fähigkeit (Chung *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2005; Belz *et al.*, 2004).

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass Immunreaktionen des intestinalen Immunsystems nicht nur durch DCs in den MLN induziert werden, sondern auch in den PP induziert werden können. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Zellen, wie B-Zellen, Makrophagen, Epithelzellen oder organisierte lymphoide Strukturen der LP, wie z.B. Cryptopatches und ILFs, an der Aktivierung von HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgenen Mäusen beteiligt sind.

4.2 Induktion von CD8⁺Foxp3⁺ Tregs in der intestinalen Mukosa

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CEDE) wie Morbus Crohn oder Kolitis ulzerosa, ebenso wie eine Vielzahl anderer Autoimmunerkrankungen, entstehen unter anderem durch eine überschießende, unkontrollierte Immunreaktion, die durch normale Regulationsmechanismen nicht wieder abgeschaltet wird. Die Interaktionen zwischen Bakterien, Epithelzellen und dem Darm-assoziierten Immunsystem führen bei diesen Patienten zu einer kontinuierlichen Stimulierung des GALTs mit intestinalen Antigenen und damit zur Zerstörung von Darmgewebe (Sartor *et al.*, 2008). Sowohl für die korrekte Justierung des Schwellenwertes von inflammatorischen Immunreaktionen gegenüber mikrobiellen Antigenen als auch für die Modulation von gewebezerstörenden Immunreaktionen sind Tregs von entscheidender Bedeutung (van Driel *et al.*, 2008). Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es verschiedene Treg-Populationen, die sich hinsichtlich ihres Phänotyps und Zytokinprofils unterscheiden. Die bekannteste Treg-Population gehört zur CD4 T-Zellpopulation. Die Population der CD4 Tregs wird unterteilt in natürlich vorkommende CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Tregs und solche, die in der Peripherie induziert werden. Darüber hinaus ist bekannt, dass spezifische Subtypen der CD8⁺ T-Zellpopulation immunsuppressives Potential besitzen. Es gibt nur wenige Modellsysteme, die die Untersuchung von CD8⁺ Tregs in der intestinalen Mukosa ermöglichen. Beispielsweise generierten Allez und Kollegen CD8⁺ Tregs durch die Stimulierung von T-Zellen aus dem peripheren Blut mit bestrahlten, allogenen, intestinalen Epithelzellen (Allez *et al.*, 2002). Diese CD8⁺ Tregs exprimieren CD101 und CD103, aber interessanterweise nicht den spezifischen Tregmarker Foxp3. Auch humane, alloantigen-induzierte CD8⁺CD103⁺ T-Zellen verfügen über regulatorisches Potential ohne die typischen Tregmarker Foxp3, GITR, CD25 und CTLA-4 zu exprimieren (Koch *et al.*, 2008). Darüber hinaus zeigen murine CD8⁺CD28⁻ T-Zellen im Gegensatz zu CD8⁺CD28⁺ T-Zellen aus Milz oder Darm immunsuppressive Aktivität, indem sie die Entwicklung einer T-Zell-vermittelten Kolitis verhindern (Menager-Marcq *et al.*, 2006). Weiterhin ist bekannt, dass $\gamma\delta$ TCR CD8⁺ T-Zellen im intestinalen Epithel an der Induktion oraler Toleranz beteiligt sind (Ke *et al.*, 1997). Die starke Varianz im Phänotyp von CD8 Tregs macht die Heterogenität dieser Population deutlich und lässt vermuten, dass es sich um verschiedene Subpopulationen von CD8⁺ Tregs handelt.

Viele Forschungsarbeiten untersuchen, ob bei Patienten mit CEDE eine Korrelation zwischen der Stärke der Entzündung und Veränderungen innerhalb der Tregpopulation besteht. Dabei werden Unterschiede zwischen zirkulierenden Tregs und solchen, die sich in der intestinalen Mukosa befinden, bestimmt. In diesen Studien werden allerdings ausschließlich $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs analysiert. Daher ist über die Rolle von $CD8^+$ Tregs bei CEDE nur wenig bekannt.

In einer Arbeit aus dem Mayer Labor wurde gezeigt, dass die Unterdrückung einer unkontrollierten Entzündung in der intestinalen Mukosa nicht nur von $CD4^+$ Tregs, sondern auch von $CD8^+$ Tregs abhängig sein kann. Die Wissenschaftler stellten fest, dass $CD8^+$ T-Zellen aus nicht-entzündeten Bereichen der LP suppressive Fähigkeiten besitzen. Im Gegensatz dazu fehlt dieses suppressive Potential bei $CD8^+$ T-Zellen aus der LP von CEDE Patienten (Brimnes *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals gezeigt, dass der Anteil $CD8^+CD25^+Foxp3^+$ T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit aktiver Kolitis ulzerosa, verglichen mit gesunden Spendern signifikant reduziert ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit Studien überein, die zeigen, dass im peripheren Blut von Patienten mit Morbus Crohn oder Kolitis ulzerosa der Anteil $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs reduziert ist. Dabei scheint die Intensität der Entzündung dem Anteil $CD4^+$ Tregs im Blut entgegengesetzt zu sein (Makita *et al.*, 2004; Maul *et al.*, 2005; Saruta *et al.*, 2007). Zusätzlich wird in Arbeiten gezeigt, dass der Anteil $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T-Zellen in der entzündeten Mukosa gegenüber nicht-entzündeten Bereichen erhöht ist (Maul *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2007). Es wird daher vermutet, dass Tregs zur Wiederherstellung der Immunhomöostase zum Ort der Entzündung migrieren. Dennoch ist die Gesamtmenge $CD4^+$ Tregs in der intestinalen Mukosa von CEDE Patienten geringer als in der entzündeten intestinalen Mukosa von Divertikulitis-Patienten, bei denen die Entzündung nicht auf eine gestörte Immunregulation zurückgeführt wird. Die Auslöser für eine Divertikulitis sind noch unklar, aber es wird ein Zusammenhang mit der fehlenden aktiven Kotentleerungsfunktion von Divertikeln vermutet. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass aktive CEDE durch einen numerischen Defekt an Tregs charakterisiert sind und die Menge an Tregs nicht ausreicht, um einer Entzündungsreaktion entgegenzuwirken. Für die Regulierung und Eindämmung der Entzündungsreaktion ist aber nicht nur die Migration von Tregs in die entzündete Mukosa wichtig. Generell muss eine ausreichende Menge an Tregs in der intestinalen Mukosa vorhanden sein, um eine Entzündung zu verhindern. Für den

Erhalt einer Langzeitremission bei CEDE-Patienten kann die Fähigkeit zur externen Regulation von Immunreaktionen von entscheidender Bedeutung sein. Der aktuelle Stand der Wissenschaft ist jedoch zu begrenzt, um eine kontrollierte Steuerung von Immunreaktionen zu ermöglichen. Ergebnisse aus Tiermodellen zeigen, dass der Transfer von regulatorischen T-Zellen hierfür von Vorteil sein kann. Dies unterstützt die Schlussfolgerung von Maul, dass der erhöhte Anteil an Tregs in der LP von CEDE Patienten immer noch nicht ausreichend ist, um überschießende Immunreaktionen zu kontrollieren. Für den therapeutischen Einsatz von Tregs zur Behandlung von CEDE müssten daher vermutlich große Mengen an Tregs transferiert werden, um das Gleichgewicht zwischen regulatorischer und inflammatorischer Antwort wieder herzustellen.

Verschiedene Protokolle zur *ex vivo* Expansion von CD4⁺ Tregs wurden etabliert. Diese basieren auf einer wiederholten Stimulierung des TCRs in Kombination mit verschiedenen Zytokinen (Earle *et al.*, 2005; Hoffmann *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2004; Ring *et al.*, 2007; Sagoo *et al.*, 2008; Roncarolo *et al.*, 2007). Mehrere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von TGF- β *in vitro* die Expression von Foxp3 induziert (Fantini *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2005). Zur Vermeidung von unkontrollierter Immunsuppression ist es wichtig, dass Tregs so manipuliert werden, dass die spezifischen Migrationsmoleküle für das Kompartiment exprimiert werden, in dem die Immunsuppression stattfinden muss. Ein Mediator, der eine dominante Rolle bei der Migration von Lymphozyten in das GALT spielt, ist Retinsäure (RA). RA ist ein Metabolit von Vitamin A. Diese induziert die Expression der darmspezifischen Migrationsmoleküle CCR9 und $\alpha_4\beta_7$ Integrin auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Iwata *et al.*, 2004; Svensson *et al.*, 2008). RA wird in großer Menge von Darm-assoziierten und Darms DCs sezerniert (Coombes *et al.*, 2007, Iwata *et al.*, 2004) und ist notwendig, damit im GALT aktivierte Lymphozyten in den Darm zurückkehren und dort ihre Effektorfunktion ausüben. Außerdem ist RA für die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase entscheidend. Zum Einen vermittelt RA DCs einen tolerogenen Phänotyp (Iliev *et al.*, 2009), und zum Anderen ist von besonderer Bedeutung, dass RA die TGF- β induzierte Konvertierung von naiven CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen in CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen durch Darm-assoziierte DCs verstärkt (Coombes *et al.*, 2007, Sun *et al.*, 2007, Mucida *et al.*, 2007). Daher ist RA in zweierlei Hinsicht für die Aufrechterhaltung intestinaler Homöostase durch Tregs von Vorteil: 1. Der Anteil

an Tregs wird durch die TGF- β -induzierte Konvertierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in Foxp3-exprimierende Tregs erhöht. 2. Der Anteil in den Darm migrierender Tregs wird erhöht. Dies wird durch *in vivo* Experimente von Kang *et al.* bestätigt. Wird die Menge Vitamin A (Retinylacetat) in der Nahrung um das 10fache erhöht, führt dies zur Induktion von darmmigrierenden CD4⁺CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁺Foxp3⁺ Tregs, die die Entwicklung einer spontanen Morbus Crohn-ähnlichen Darmerkrankung im Mausmodell verhindern. Darüber hinaus konnten die induzierten CCR9⁺Foxp3⁺ Tregs im Transfermodell effektiv eine T-Zell-vermittelte Darmentzündung heilen (Kang *et al.*, 2009). Die effektive Rolle von RA bei der TGF- β vermittelten Induktion und Expansion von Foxp3⁺ Tregs macht deutlich, dass das GALT ein eigenes System entwickelt hat, um das sensible Gleichgewicht zwischen der Darmflora und dem Immunsystem aufrecht zu erhalten (Coombes *et al.*, 2007, Sun *et al.*, 2007, Mucida *et al.*, 2007, von Boehmer *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Studie wird erstmals gezeigt, dass das Potential von TGF- β und RA zur Konvertierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in CD4⁺ Tregs auch für CD8⁺ T-Zellen gilt. Die Aktivierung naiver CD8⁺ T-Zellen in Anwesenheit von TGF- β und RA induziert sowohl in murinen als auch humanen CD8⁺ T-Zellen die Expression von Foxp3, dem Schlüsselmolekül für Tregs. Im Gegensatz zu CD8⁺Foxp3⁻ Tregs zeigen diese CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen einen Phänotyp, der dem von natürlichen CD4⁺Foxp3⁺ Tregs ähnelt. Die TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen zeigen eine verstärkte Expression der Treg-spezifischen Moleküle CD25, Gpr83 und CTLA-4. Neben der Überexpression Treg-spezifischer Moleküle zeigen die humanen und murinen TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ Tregs ebenfalls die Fähigkeit die Proliferation von CD4⁺ Reporter T-Zellen *in vitro* zu supprimieren.

Bei der Anwendung von *in vitro* Systemen ist die Komplexität von systemischen und organspezifischen Einflüssen nicht erfassbar. Für die biologische Relevanz von Tregs ist ihre regulatorische Aktivität in einem komplexen *in vivo* System von größerer Bedeutung. Daher ist besonders nennenswert, dass TGF- β /RA-induzierte CD8⁺Foxp3⁺ Tregs nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* im Kontakthypersensibilitätsmodell ein hohes suppressives Potential zeigen. Das regulatorische Potential *in vivo* macht CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen zu potentiellen Kandidaten für den Einsatz in der Immunzelltherapie.

In vitro und *in vivo* Untersuchungen von polyklonalen CD8⁺ Tregs belegen die Existenz von verschiedenen CD8⁺ Tregpopulationen, die sich hinsichtlich ihres Phänotyps und Suppressionsmechanismus deutlich voneinander unterscheiden. Ein Mechanismus zur Suppression von Immunreaktionen ist die negative Signalwirkung auf die Zielzelle oder APC, beispielsweise über die Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen. Ein Beispiel ist das immunsuppressive Zytokin TGF- β . Unter anderem spielt es bei CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ und CD8⁺CD28⁻ Tregs zur Kontrolle von Immunreaktionen in der intestinalen Mukosa eine wichtige Rolle (Saurer *et al.*, 2004; Menager-Marcq *et al.*, 2006). Darüber hinaus ist eine Population von CD8⁺CD25⁺LAG3⁺ Tregs beschrieben, die über die Sekretion des CC Chemokinliganden 4 (CCL4) immunsuppressiv wirkt, indem CCL4 die Aktivierung von T-Zellen durch Störung der T-Zell-Rezeptor Signalkaskade inhibiert (Joosten *et al.*, 2007). Die Expression von CCL4 und TGF- β in TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen ist auf mRNA Ebene im Vergleich zu den TGF- β /RA-behandelten CD8⁺Foxp3⁻ T-Zellen nicht erhöht, und somit nicht relevant für ihre regulatorische Aktivität. Das immunsuppressive Zytokin IL-10, das auch von CD8⁺CD122⁺ Tregs produziert wird und die Produktion von IFN- γ sowie die Proliferation von CD8⁺ Reporter T-Zellen supprimiert (Rifa'i *et al.*, 2008), wird von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen ebenfalls nicht verstärkt exprimiert. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass RA die TGF- β -vermittelte Induktion von IL-10 inhibiert. Dies wurde bereits für CD4⁺ T-Zellen gezeigt (Maynard *et al.*, 2009).

Die suppressive Wirkung von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ Tregs bleibt aus, wenn der Zell-Zell-Kontakt mit den Reporterzellen und APCs nicht mehr vorliegt. Dies bedeutet, dass die in dieser Arbeit generierten CD8⁺Foxp3⁺ Tregs ihre suppressive Aktivität nicht über lösliche Faktoren, sondern hauptsächlich über Zell-Zell-kontaktabhängige Mechanismen ausüben. Die Zell-Zell-kontaktabhängige Suppression von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen kann entweder indirekt über die Modulation des Aktivierungsstatus von DCs oder direkt auf die CD4⁺ Effektor T-Zellen wirken. Der Einfluss von inhibitorischen Rezeptoren wie GITR, LAG3 und PD-1 sowie CD39/CD73 als supprimierende Effektormoleküle in TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen ist aufgrund der gleichen Expressionsstärke der mRNA in TGF- β /RA-behandelten CD8⁺Foxp3⁻ und CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen unwahrscheinlich. Dies gilt ebenso für das Integrin CD103, das auf bestimmten CD4⁺ und CD8⁺ Tregpopulationen exprimiert wird. Es ist wahrscheinlicher, dass CD103 als

Marker zur Unterscheidung verschiedener Tregpopulationen dient, die in mukosalen Geweben des Darms und der Lunge vorkommen, als dass es direkt an der suppressiven Aktivität von Tregs mitwirkt.

Im Gegensatz dazu wird der Tregmarker CD25 in TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ im Vergleich zu CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen überexprimiert. Durch die Bindung von IL-2 an CD25 wird Effektorzellen essentielles IL-2 entzogen und deren Proliferation unterdrückt (Thornton *et al.*, 1998; Vignali *et al.*, 2008). Inwieweit die Überexpression von CD25 zur Zell-Zell-kontaktabhängigen suppressiven Aktivität von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen beiträgt, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Auffallend ist die starke Überexpression der mRNA des Treg-spezifischen Oberflächenmoleküls Gpr83 in TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen. Gpr83 ist spezifisch auf Tregs und nicht auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen hochreguliert (Fontenot *et al.*, 2005; Sugimoto *et al.*, 2006). In einer Arbeit von Hansen *et al.* wird gezeigt, dass die induzierte Expression von Foxp3 eng mit der von Gpr83 korreliert. Die ektopische Überexpression von Foxp3 durch retroviralen Gentransfer in naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen induziert die Expression von Gpr83. Im Gegensatz dazu führt die ektopische Überexpression von Gpr83 in naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nicht zur Expression von Foxp3 (Hansen *et al.*, 2006). Die biologische Funktion der Expression von Gpr83 auf Tregs ist noch ungeklärt. Studien zeigen, dass Gpr83 für die Entwicklung und regulatorische Aktivität von nTregs und TGF- β -induzierten Tregs nicht essentiell ist (Lu *et al.*, 2007; Toms *et al.*, 2008). Dem gegenüber wird in Gpr83-transfizierten CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen unter entzündlichen Bedingungen *in vivo* die Expression von Foxp3 hochreguliert und eine suppressive Aktivität erworben (Hansen *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Gpr83 in Anwesenheit von entzündlichen Mediatoren eher bei der Konvertierung von Foxp3⁻ T-Zellen zu Foxp3⁺ Tregs eine Rolle spielt als bei der Ausübung regulatorischer Aktivität.

In der Literatur ist beschrieben, dass sich die immunsuppressive Wirkung von CD8⁺ Tregs hauptsächlich in der Zytolyse der Zielzellen äußert (Hu *et al.*, 2004; Correale *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 1988; Madakamutil *et al.*, 2003). Die Zytolyse über die Sekretion von Granzymen galt lange Zeit als spezifisch für natürliche Killerzellen und zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (Lieberman *et al.*, 2003). In Arrayanalysen wird allerdings auch bei CD4⁺ Tregs eine erhöhte Expression von Granzym B nachgewiesen.

Deshalb wird davon ausgegangen, dass auch CD4⁺ Tregs über Zytolyse regulatorisch wirken (McHugh *et al.*, 2002). Dies wird durch Studien belegt, die zeigen, dass Tregs eine zytotoxische Wirkung auf B-Zellen, NK Zellen und zytotoxische CD8⁺ T-Zellen ausüben. Dieser Prozess ist Granzym B-abhängig und bewirkt beispielsweise die Unterdrückung einer Immunantwort gegenüber einem Tumor (Cao *et al.*, 2007). Weiterhin ist belegt, dass intraepitheliale CD8 $\alpha\alpha$ T-Zellen Granzym B exprimieren (Cai *et al.*, 2009). Auch CD8⁺ Tregs, die die natürliche Fähigkeit zur Produktion von Granzymen besitzen, benutzen diesen Mechanismus zur Kontrolle einer Immunreaktion. Daher lässt die erhöhte Expression von Granzym B und Perforin in den TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen vermuten, dass diese Zellen im *in vitro* Inhibitionsassay mit CD4⁺ Reporterzellen und APCs ihre suppressive Aktivität über die Zytolyse der CD4⁺ Reporter T-Zellen oder APCs ausüben. Diese Hypothese muss in weiteren Untersuchungen experimentell bestätigt werden.

Es ist weiterhin denkbar, dass das überexprimierte Treg-spezifische Oberflächenmolekül CTLA-4 bei der Zell-Zell-kontaktabhängigen Suppression von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ Tregs von Bedeutung ist. Für das Humansystem wurde kürzlich gezeigt, dass nicht Foxp3 sondern CTLA-4 ein vielversprechendes Molekül für die regulatorische Aktivität von humanen CD4⁺ Tregs ist (Zheng *et al.*, 2008). In dieser Studie weisen *in vitro* generierte CTLA-4-durchflusszytometrisch sortierte CD4⁺ T-Zellen neben einer starken Expression von Foxp3 ein hohes suppressives Potential gegenüber CD4⁺ Reporter T-Zellen *in vitro* auf. Darüber hinaus bewirkt die Transfektion von naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit CTLA-4 Plasmid die Ausbildung einer suppressiven Aktivität, die mit dem suppressiven Potential von nTregs vergleichbar ist, obwohl diese transfizierten CTLA-4⁺ CD4⁺ T-Zellen kein Foxp3 exprimieren. Im Gegensatz dazu führt die Transfektion mit Foxp3 weder zu einem suppressiven Phänotyp noch zur Expression von CTLA-4. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint die erhöhte Expression von CTLA-4 in den murinen und humanen TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen mit dem suppressivem Potential dieser Zellen in engem Zusammenhang zu stehen. Ein *in vitro* Inhibitionsassay mit CTLA-4-blockierenden Antikörpern würde die funktionelle Rolle von CTLA-4 auf murinen und humanen TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen aufklären.

Die in dieser Arbeit *in vitro* generierten CD8⁺ Tregs könnten für die Behandlung von CEDE von besonderem Interesse sein. Die Stimulierung von naiven CD8⁺ T-Zellen in Anwesenheit von TGF- β und RA führt sowohl in CD8⁺Foxp3⁻ als auch CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen zu einer vergleichbar starken Expression der darmspezifischen Migrationsmoleküle CD103 und CCR9. Hierdurch wird die Migration dieser Zellen in den Darm begünstigt. Die Migration dieser Zellen in den Darm muss in weiteren Experimenten bestätigt werden. Zur Verfolgung der TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ Tregs *in vivo* werden diese intrazellulär mit CFSE markiert und adoptiv transferiert. Die *in vitro* Generierung von darmmigrierenden TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ Tregs könnte, wie von Kang anhand von CD4⁺CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁺Foxp3⁺ Tregs gezeigt, eine gute Möglichkeit zur Therapie von CEDE darstellen. Daher ist besonders wichtig das Potential, von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ Tregs zur Eindämmung einer Darmentzündung zu untersuchen. Die CD4⁺CD45RB^{high}-vermittelte Kolitis in immundefizienten SCID oder NOD Mäusen ist ein geeignetes Modell für diese Fragestellung.

Die Immunzelltherapie durch den Transfer von Tregs ist ein vielversprechendes Mittel zur Therapie von Autoimmunerkrankungen. Entscheidend für den Einsatz von Tregs als Therapeutikum ist die Stabilität der suppressiven Aktivität, die im Zusammenhang mit der stabilen Expression von Foxp3 steht. Die Konvertierung von Tregs in Effektorzellen *in vivo* hätte unkontrollierbare Folgen und würde den klinischen Einsatz ausschließen. Die vollständige Demethylierung von CpG-Motiven im *foxp3* Promotor korreliert mit der stabilen Expression von Foxp3. Die vollständige Methylierung des *foxp3* Promotors in TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ Tregs spiegelt die transiente Expression von Foxp3 in diesen Zellen wider, wodurch eine Konvertierung in CD8⁺Foxp3⁻ T-Zellen *in vivo* nicht ausgeschlossen werden kann. Allerdings wurde das Methylierungsmuster des *foxp3* Promotors und die Stabilität der Foxp3 Expression von *in vivo* generierten CD8⁺Foxp3⁺ Tregs noch nicht untersucht. Darüber hinaus ist nicht bekannt, ob *in vivo* induzierte CD8⁺Foxp3⁺ Tregs nach erfolgreicher Immunsuppression in zytotoxische Effektor oder zu Gedächtniszellen differenzieren oder in Apoptose übergehen. Daher sind für den therapeutischen Einsatz von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen Informationen über die Vitalität und das Differenzierungsschicksal nach *in vivo* Applikation notwendig. Für den Einsatz von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ Tregs ist die stabile Expression

von Foxp3 notwendig. Die Stabilität der Foxp3 Expression *in vitro* kann sich allerdings von der unter *in vivo* Bedingungen unterscheiden. Beispielsweise exprimieren Gpr83-transfizierte CD4⁺ T-Zellen *in vitro* kein Foxp3 und zeigen keine suppressive Aktivität, aber unter inflammatorischen Bedingungen *in vivo* differenzieren diese Zellen zu Foxp3⁺ Tregs. Daher sind die Untersuchung der Stabilität der Foxp3 Expression *in vivo* und das Methylierungsmuster des *foxp3* Promotors von TGF- β /RA-induzierten CD8⁺ Tregs nach *in vivo* Applikation sinnvoll.

Die in dieser Arbeit induzierten CD8⁺Foxp3⁺ Tregs könnten zukünftig für die Therapie von Erkrankungen eingesetzt werden, die im Zusammenhang mit einer CD8⁺ Treg-Defizienz stehen. Hierzu müssen sie derart modifiziert werden, dass ihre regulatorische Aktivität langfristig aufrechterhalten wird. Eine denkbare Möglichkeit liegt darin, durch Veränderung der Kultivierungsbedingungen eine stabile Foxp3 Expression sicherzustellen. Im Hinblick auf die Generierung großer Mengen CD8⁺Foxp3⁺ Tregs ist es sinnvoll zu untersuchen, welche Subpopulation innerhalb der CD8⁺ T-Zellen bei der Behandlung mit TGF- β und RA das Potential besitzt zu CD8⁺Foxp3⁺ Tregs zu konvertieren. Die durchflusszytometrische Sortierung von humanen Foxp3-exprimierenden T-Zellen ist nicht möglich. Daher ist vor allem für die therapeutische Applikation im Humansystem eine detailliertere Charakterisierung der exprimierten Oberflächenmoleküle, z.B. bezüglich der Expression von CD127, von TGF- β /RA-behandelten CD8⁺Foxp3⁻ und CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen nötig.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass nicht nur CD4⁺ Tregs, sondern auch CD8⁺ Tregs bei der Aufrechterhaltung intestinaler Homöostase eine wichtige Rolle spielen. Die Generierung CD8⁺Foxp3⁺ Tregs in Abhängigkeit von TGF- β und RA bietet neue Möglichkeiten zur therapeutischen Behandlung von entzündlichen Darm-erkrankungen. Da der Induktionsprozess von CD8⁺Foxp3⁺ Tregs *in vivo* in weiten Teilen noch unbekannt ist und viele Fragen, wie z.B. die Foxp3 Stabilität, die Migration und der Phänotyp *in vivo*, noch ungeklärt sind, ist eine intensive Weiterführung der Charakterisierung dieser Zellen für den therapeutischen Einsatz notwendig.

ZUSAMMEN- FASSUNG

5 Zusammenfassung

Das intestinale Immunsystem stellt den größten und komplexesten Teil des menschlichen Immunsystems dar und benötigt durch die exponierte Lage ein besonderes Gleichgewicht zwischen Immunität und Toleranz. Bis heute ist nicht vollständig geklärt in welchen intestinalen Kompartimenten die Induktion von T-Zell-vermittelter Immunität und Toleranz stattfindet. Zusätzlich werden immer neue T-Zell-Subpopulationen im intestinalen Immunsystem identifiziert, die phänotypisch und funktionell noch nicht charakterisiert sind. Insbesondere die Induktion von CD8⁺ T-Zell-Antworten in der intestinalen Mukosa ist wenig untersucht.

Die Ergebnisse im ersten Teil dieser Arbeit zeigen, dass neben den mesenterischen Lymphknoten weitere lymphoide Strukturen wie die Peyer'schen Platten für die Induktion von CD8⁺ Effektor T-Zellantworten in der intestinalen Mukosa entscheidend sind. Trotz der operativen Resektion der mesenterischen Lymphknoten kommt es in VILLIN-HA transgenen Tieren zur Aktivierung von Darm-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und einer fulminanten intestinalen Entzündung. In FTY720 Experimenten, bei denen die Migration von Lymphozyten aus lymphoiden Organen inhibiert ist, konnte die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen in den Peyer'schen Platten nachgewiesen werden. Dabei werden intestinale Antigene von spezialisierten Dendritischen Zellen aufgenommen und an den Ort der Antigenpräsentation transportiert. Die Milz ist für das intestinale Immunsystem eher redundant, da es in der Milz im VILLIN-HA transgenen Mausmodell nicht zur Präsentation des intestinalen Antigens kommt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Induktion und der Phänotyp von intestinalen CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen analysiert. Untersuchungen im VILLIN-HA transgenen Mausmodell zeigen, dass Darm-spezifische CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen in den Strukturen des GALT induziert werden. In *in vitro* Studien wurde gezeigt, dass die Induktion muriner und humaner CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen durch Darm-relevante Mediatoren wie TGF- β und Retinsäure vermittelt wird. Umfangreiche Transkriptomanalysen dieser *in vitro*-induzierten CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen zeigen die erhöhte Expression der Treg-spezifischen Markermoleküle CD25, Gpr83 und CTLA-4. *In vitro* und *in vivo* Analysen zeigen das hohe immunsuppressive Potential dieser Zellen.

Die phänotypische Untersuchung der CD8⁺ T-Zellpopulation im peripheren Blut von Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung zeigt eine deutliche Reduktion CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen während des akuten Schubes. Die Modulation der Anzahl CD8⁺Foxp3⁺ T-Zellen könnte daher ein neuer Ansatzpunkt zur Immuntherapie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sein.

LITERATUR

6 Literatur

- Ahrendt M, Hammerschmidt SI, Pabst O, Pabst R, Bode U. Stromal cells confer lymph node-specific properties by shaping a unique microenvironment influencing local immune responses. *J Immunol* 2008;181:1898-907.
- Allez M, Brimnes J, Dotan I, Mayer L. Expansion of CD8⁺ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2002;123:1516-26.
- Annacker O, Coombes JL, Malmstrom V et al. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med* 2005;202:1051-61.
- Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol* 2006;24:607-56.
- Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003;55:241-69.
- Austrup F, Vestweber D, Borges E et al. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 1997;385:81-83.
- Baumgart DC, Dignass AU. Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:685-94.
- Beagley KW, Elson CO. Cells and cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21:347-66.
- Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 2007;7:875-88.
- Belkaid Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. *Eur J Immunol* 2008;38:918-21.
- Belz GT, Smith CM, Eichner D et al. Cutting edge: conventional CD8⁺ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J Immunol* 2004;172:1996-2000.
- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20-21.
- Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* 2007;204:1765-74.
- Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008;453:1051-57.
- Bhan AK, Mizoguchi E, Smith RN, Mizoguchi A. Colitis in transgenic and knockout animals as models of human inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 1999;169:195-207.
- Bienenstock J, Perey DY. Immune mechanisms of mucosal resistance. *Med Clin North Am* 1972;56:391-402.
- Bienvendu B, Martin B, Auffray C, Cordier C, Becourt C, Lucas B. Peripheral CD8⁺CD25⁺ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J Immunol* 2005;175:246-53.

- Billerbeck E, Blum HE, Thimme R. Parallel expansion of human virus-specific FoxP3⁻ effector memory and de novo-generated FoxP3⁺ regulatory CD8⁺ T cells upon antigen recognition in vitro. *J Immunol* 2007;179:1039-48.
- Bimczok D, Sowa EN, Faber-Zuschratter H, Pabst R, Rothkotter HJ. Site-specific expression of CD11b and SIRPalpha (CD172a) on dendritic cells: implications for their migration patterns in the gut immune system. *Eur J Immunol* 2005;35:1418-27.
- Boden EK, Snapper SB. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24:733-41.
- Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 1998;188:1929-39.
- Bopp T, Becker C, Klein M et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 2007;204:1303-10.
- Brimnes J, Allez M, Dotan I, Shao L, Nakazawa A, Mayer L. Defects in CD8⁺ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2005;174:5814-22.
- Brinkmann V, Cyster JG, Hla T. FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function. *Am J Transplant* 2004;4:1019-25.
- Briskin MJ, McEvoy LM, Butcher EC. MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA1. *Nature* 1993;363:461-64.
- Bruder D, Westendorf AM, Hansen W et al. On the edge of autoimmunity: T-cell stimulation by steady-state dendritic cells prevents autoimmune diabetes. *Diabetes* 2005;54:3395-401.
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;27:68-73.
- Brustle A, Heink S, Huber M et al. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 2007;8:958-66.
- Cai SF, Fehniger TA, Cao X et al. Differential expression of granzyme B and C in murine cytotoxic lymphocytes. *J Immunol* 2009;182:6287-97.
- Campbell DJ, Butcher EC. Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J Exp Med* 2002;195:135-41.
- Cao X, Cai SF, Fehniger TA et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007;27:635-46.
- Chaput N, Louafi S, Bardier A et al. Identification of CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* 2009;58:520-529.
- Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 2001;14:715-25.
- Chen W, Jin W, Hardegen N et al. Conversion of peripheral CD4⁺. *J Exp Med* 2003;198:1875-86.

- Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994;265:1237-40.
- Chirido FG, Millington OR, Beacock-Sharp H, Mowat AM. Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur J Immunol* 2005;35:1831-40.
- Chung Y, Chang JH, Kweon MN, Rennert PD, Kang CY. CD8alpha-11b+ dendritic cells but not CD8alpha+ dendritic cells mediate cross-tolerance toward intestinal antigens. *Blood* 2005;106:201-6.
- Chung Y, Chang JH, Kim BS, Lee JM, Kim HY, Kang CY. Anatomic location defines antigen presentation by dendritic cells to T cells in response to intravenous soluble antigens. *Eur J Immunol* 2007;37:1453-62.
- Cobbold S, Waldmann H. Infectious tolerance. *Curr Opin Immunol* 1998;10:518-24.
- Cobbold SP, Castejon R, Adams E et al. Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol* 2004;172:6003-10.
- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007;450:566-69.
- Collison LW, Pillai MR, Chaturvedi V, Vignali DA. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol* 2009;182:6121-28.
- Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007;204:1757-64.
- Correale J, Villa A. Isolation and characterization of CD8+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2008;195:121-34.
- Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E et al. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* 2003;102:4107-14.
- Darrasse-Jeze G, Deroubaix S, Mouquet H et al. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2009;206:1853-62.
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007;204:1257-65.
- Denning TL, Wang YC, Patel SR, Williams IR, Pulendran B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 2007;8:1086-94.
- Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med* 2002;196:247-53.
- Dudda JC, Lembo A, Bachtanian E et al. Dendritic cells govern induction and reprogramming of polarized tissue-selective homing receptor patterns of T cells: important roles for soluble factors and tissue microenvironments. *Eur J Immunol* 2005;35:1056-65.

- Duerkop BA, Vaishnava S, Hooper LV. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity* 2009;31:368-76.
- Earle KE, Tang Q, Zhou X et al. In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. *Clin Immunol* 2005;115:3-9.
- Endharti AT, Rifa'i M, Shi Z et al. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol* 2005;175:7093-97.
- Fantini MC, Dominitzki S, Rizzo A, Neurath MF, Becker C. In vitro generation of CD4+ CD25+ regulatory cells from murine naive T cells. *Nat Protoc* 2007;2:1789-94.
- Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev* 2005;206:232-59.
- Farstad IN, Carlsen H, Morton HC, Brandtzaeg P. Immunoglobulin A cell distribution in the human small intestine: phenotypic and functional characteristics. *Immunology* 2000;101:354-63.
- Fehervari Z, Sakaguchi S. Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int Immunol* 2004;16:1769-80.
- Floess S, Freyer J, Siewert C et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 2007;5:e38.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-336.
- Fontenot JD, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* 2005;202:901-6.
- Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996;157:1261-70.
- Fuss IJ, Heller F, Boirivant M et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004;113:1490-1497.
- Fuss IJ, Strober W. The role of IL-13 and NK T cells in experimental and human ulcerative colitis. *Mucosal Immunol* 2008;1 Suppl 1:S31-S33.
- Gad M, Brimnes J, Claesson MH. CD4+ T regulatory cells from the colonic lamina propria of normal mice inhibit proliferation of enterobacteria-reactive, disease-inducing Th1-cells from scid mice with colitis. *Clin Exp Immunol* 2003;131:34-40.
- Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 2005;174:1783-86.
- Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2002;2:46-53.

- Gurtner GJ, Newberry RD, Schloemann SR, McDonald KG, Stenson WF. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Gastroenterology* 2003;125:1762-73.
- Hahn A, Thiessen N, Pabst R, Buettner M, Bode U. Mesenteric lymph nodes are not required for an intestinal immunoglobulin A response to oral cholera toxin. *Immunology* 2009.
- Hammerschmidt SI, Ahrendt M, Bode U et al. Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. *J Exp Med* 2008;205:2483-90.
- Hansen W, Loser K, Westendorf AM et al. G protein-coupled receptor 83 overexpression in naive CD4+. *J Immunol* 2006;177:209-15.
- Haribhai D, Lin W, Relland LM, Truong N, Williams CB, Chatila TA. Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *J Immunol* 2007;178:2961-72.
- Harrington L, Srikanth CV, Antony R et al. Deficiency of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances commensal-induced antibody responses and protects against *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Infect Immun* 2008;76:3045-53.
- Heath VL, Murphy EE, Crain C, Tomlinson MG, O'Garra A. TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *Eur J Immunol* 2000;30:2639-49.
- Hershberg RM, Mayer LF. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol Today* 2000;21:123-28.
- Ho J, Kurtz CC, Naganuma M, Ernst PB, Cominelli F, Rivera-Nieves J. A CD8+/CD103high T cell subset regulates TNF-mediated chronic murine ileitis. *J Immunol* 2008;180:2573-80.
- Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Edinger M. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood* 2004;104:895-903.
- Honda K, Takeda K. Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. *Mucosal Immunol* 2009;2:187-96.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.
- Hsieh CS, Liang Y, Tyznik AJ, Self SG, Liggitt D, Rudensky AY. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 2004;21:267-77.
- Hu D, Ikizawa K, Lu L, Sanchirico ME, Shinohara ML, Cantor H. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat Immunol* 2004;5:516-23.
- Huang FP, Platt N, Wykes M et al. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* 2000;191:435-44.
- Iliev ID, Spadoni I, Mileti E et al. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut* 2009;58:1481-89.

- Iliev ID, Mileti E, Matteoli G, Chieppa M, Rescigno M. Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunol* 2009;2:340-350.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006;126:1121-33.
- Ivanov II, Frutos RL, Manel N et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 2008;4:337-49.
- Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 1999;190:229-39.
- Iwasaki A. Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:381-418.
- Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 2004;21:527-38.
- Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev* 2006;212:256-71.
- Izcue A, Hue S, Buonocore S et al. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity* 2008;28:559-70.
- Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol* 2009;27:313-38.
- Jasperse LK, Bucher C, Panoskaltsis-Mortari A et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical regulator of acute graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2008;111:3257-65.
- Jiang H, Ware R, Stall A, Flaherty L, Chess L, Pernis B. Murine CD8+ T cells that specifically delete autologous CD4+ T cells expressing V beta 8 TCR: a role of the Qa-1 molecule. *Immunity* 1995;2:185-94.
- Johansson-Lindbom B, Svensson M, Wurbel MA, Malissen B, Marquez G, Agace W. Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *J Exp Med* 2003;198:963-69.
- Johansson-Lindbom B, Svensson M, Pabst O et al. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med* 2005;202:1063-73.
- Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 2002;196:255-60.
- Joosten SA, van Meijgaarden KE, Savage ND et al. Identification of a human CD8+ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:8029-34.
- Kang SG, Wang C, Matsumoto S, Kim CH. High and low vitamin A therapies induce distinct FoxP3+ T-cell subsets and effectively control intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2009;137:1391-402.

- Kapp JA, Ke Y. The role of gammadelta TCR-bearing T cells in oral tolerance. *Res Immunol* 1997;148:561-67.
- Ke Y, Pearce K, Lake JP, Ziegler HK, Kapp JA. Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance. *J Immunol* 1997;158:3610-3618.
- Khattar M, Chen W, Stepkowski SM. Expanding and converting regulatory T cells: a horizon for immunotherapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2009;57:199-204.
- Kleinschek MA, Owyang AM, Joyce-Shaikh B et al. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2007;204:161-70.
- Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol* 2006;177:6780-6786.
- Koch SD, Uss E, van Lier RA, ten Berge IJ. Alloantigen-induced regulatory CD8+CD103+ T cells. *Hum Immunol* 2008;69:737-44.
- Kohne G, Schneider T, Zeitz M. Special features of the intestinal lymphocytic system. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1996;10:427-42.
- Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von BH. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 2005;6:1219-27.
- Kumar V. Homeostatic control of immunity by TCR peptide-specific Tregs. *J Clin Invest* 2004;114:1222-26.
- Lacy-Hulbert A, Smith AM, Tissire H et al. Ulcerative colitis and autoimmunity induced by loss of myeloid alphav integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:15823-28.
- Lan RY, Mackay IR, Gershwin ME. Regulatory T cells in the prevention of mucosal inflammatory diseases: patrolling the border. *J Autoimmun* 2007;29:272-80.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;201:233-40.
- Lee YH, Ishida Y, Rifa'i M, Shi Z, Isobe K, Suzuki H. Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2008;180:825-32.
- Lefrancois L, Parker CM, Olson S et al. The role of beta7 integrins in CD8 T cell trafficking during an antiviral immune response. *J Exp Med* 1999;189:1631-38.
- Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003;3:361-70.
- Liu LM, MacPherson GG. Lymph-borne (veiled) dendritic cells can acquire and present intestinally administered antigens. *Immunology* 1991;73:281-86.
- Lu L, Werneck MB, Cantor H. The immunoregulatory effects of Qa-1. *Immunol Rev* 2006;212:51-59.
- Lu L, Cantor H. Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 2008;5:401-6.

- Lu LF, Gavin MA, Rasmussen JP, Rudensky AY. G protein-coupled receptor 83 is dispensable for the development and function of regulatory T cells. *Mol Cell Biol* 2007;27:8065-72.
- Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004;303:1662-65.
- Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol* 2008;1:11-22.
- Madakamutil LT, Maricic I, Sercarz E, Kumar V. Regulatory T cells control autoimmunity in vivo by inducing apoptotic depletion of activated pathogenic lymphocytes. *J Immunol* 2003;170:2985-92.
- Madara JL. Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu Rev Physiol* 1998;60:143-59.
- Mahic M, Henjum K, Yaqub S et al. Generation of highly suppressive adaptive CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *Eur J Immunol* 2008;38:640-646.
- Mahnke K, Enk AH. Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;293:133-50.
- Makita S, Kanai T, Oshima S et al. CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol* 2004;173:3119-30.
- Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 2003;197:111-19.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006;441:231-34.
- Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L et al. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004;351:2069-79.
- Matloubian M, Lo CG, Cinamon G et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 2004;427:355-60.
- Matsuoka K, Inoue N, Sato T et al. T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. *Gut* 2004;53:1303-8.
- Maul J, Loddenkemper C, Mundt P et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005;128:1868-78.
- Mayer L. Mucosal immunity. *Immunol Rev* 2005;206:5.
- Maynard CL, Weaver CT. Intestinal effector T cells in health and disease. *Immunity* 2009;31:389-400.
- Maynard CL, Hatton RD, Helms WS, Oliver JR, Stephensen CB, Weaver CT. Contrasting roles for all-trans retinoic acid in TGF-beta-mediated induction of Foxp3 and Il10 genes in developing regulatory T cells. *J Exp Med* 2009;206:343-57.

- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002;16:311-23.
- Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004;4:762-74.
- Menager-Marcq I, Pomie C, Romagnoli P, van Meerwijk JP. CD8+. *Gastroenterology* 2006;131:1775-85.
- Miller A, Lider O, Weiner HL. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J Exp Med* 1991;174:791-98.
- Min WP, Zhou D, Ichim TE et al. Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance. *J Immunol* 2003;170:1304-12.
- Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 1993;75:274-82.
- Mora JR, Bono MR, Manjunath N et al. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 2003;424:88-93.
- Morgan DJ, Liblau R, Scott B et al. CD8(+) T cell-mediated spontaneous diabetes in neonatal mice. *J Immunol* 1996;157:978-83.
- Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, Liggitt D, Watson JD. CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *J Exp Med* 1993;178:237-44.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57.
- Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003;170:3939-43.
- Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003;3:331-41.
- Mucida D, Park Y, Kim G et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007;317:256-60.
- Muller CA, Autenrieth IB, Peschel A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1297-307.
- Murai M, Turovskaya O, Kim G et al. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 2009;10:1178-84.
- Najafian N, Chitnis T, Salama AD et al. Regulatory functions of CD8+. *J Clin Invest* 2003;112:1037-48.

- Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 2003;171:6173-77.
- Nancey S, Holvoet S, Graber I et al. CD8+ cytotoxic T cells induce relapsing colitis in normal mice. *Gastroenterology* 2006;131:485-96.
- Neurath MF, Weigmann B, Finotto S et al. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med* 2002;195:1129-43.
- Niess JH, Brand S, Gu X et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005;307:254-58.
- Niess JH. Role of mucosal dendritic cells in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:5138-48.
- Ohashi PS, DeFranco AL. Making and breaking tolerance. *Curr Opin Immunol* 2002;14:744-59.
- Ohnmacht C, Pullner A, King SB et al. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med* 2009;206:549-59.
- Pabst O, Wahl B, Bernhardt G, Hammerschmidt SI. Mesenteric lymph node stroma cells in the generation of intestinal immune responses. *J Mol Med* 2009;87:945-51.
- Palmer E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 2003;3:383-91.
- Patsos G, Corfield A. Management of the human mucosal defensive barrier: evidence for glycan legislation. *Biol Chem* 2009;390:581-90.
- Perruche S, Zhang P, Liu Y, Saas P, Bluestone JA, Chen W. CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nat Med* 2008;14:528-35.
- Poussier P, Ning T, Banerjee D, Julius M. A unique subset of self-specific inraintestinal T cells maintains gut integrity. *J Exp Med* 2002;195:1491-97.
- Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 1993;5:1461-71.
- Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 2008;453:65-71.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118:229-41.
- Rao PE, Petrone AL, Ponath PD. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- β . *J Immunol* 2005;174:1446-55.

- Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000;192:295-302.
- Rennert PD, James D, Mackay F, Browning JL, Hochman PS. Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin beta receptor. *Immunity* 1998;9:71-79.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001;2:361-67.
- Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I, Suzuki H. Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med* 2004;200:1123-34.
- Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2005;6:507-14.
- Ring S, Thome M, Pretsch L, Enk AH, Mahnke K. Expanded murine regulatory T cells: analysis of phenotype and function in contact hypersensitivity reactions. *J Immunol Methods* 2007;326:10-21.
- Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol* 2007;7:585-98.
- Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:323-70.
- Sagoo P, Lombardi G, Lechler RI. Regulatory T cells as therapeutic cells. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13:645-53.
- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6:345-52.
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775-87.
- Salazar-Gonzalez RM, Niess JH, Zammit DJ et al. CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. *Immunity* 2006;24:623-32.
- Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008;134:577-94.
- Saurer L, Seibold I, Rihs S, Vallan C, Dumrese T, Mueller C. Virus-induced activation of self-specific TCR alpha beta CD8 alpha alpha intraepithelial lymphocytes does not abolish their self-tolerance in the intestine. *J Immunol* 2004;172:4176-83.
- Saurer L, Mueller C. T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. *Allergy* 2009;64:505-19.
- Schatton T, Schutte U, Frank NY et al. Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells. *Cancer Res* 2010;70:697-708.
- Schraml BU, Hildner K, Ise W et al. The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* 2009;460:405-9.
- Shahrara S, Huang Q, Mandelin AM, Pope RM. TH-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R93.

- Shen L, Turner JR. Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G577-G582.
- Shevach EM. Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med* 2001;193:F41-F46.
- Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006;25:195-201.
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002;3:135-42.
- Singh B, Read S, Asseman C et al. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev* 2001;182:190-200.
- Smythies LE, Sellers M, Clements RH et al. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005;115:66-75.
- Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 2008;124:13-22.
- Spahn TW, Weiner HL, Rennert PD et al. Mesenteric lymph nodes are critical for the induction of high-dose oral tolerance in the absence of Peyer's patches. *Eur J Immunol* 2002;32:1109-13.
- Spahn TW, Muller MK, Domschke W, Kucharzik T. Role of lymphotoxins in the development of Peyer's patches and mesenteric lymph nodes: relevance to intestinal inflammation and treatment. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1072:187-93.
- Steinhoff U, Brinkmann V, Klemm U et al. Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells. *Immunity* 1999;11:349-58.
- Stenstad H, Ericsson A, Johansson-Lindbom B et al. Gut-associated lymphoid tissue-primed CD4+ T cells display CCR9-dependent and -independent homing to the small intestine. *Blood* 2006;107:3447-54.
- Stenstad H, Svensson M, Cucak H, Kotarsky K, Agace WW. Differential homing mechanisms regulate regionalized effector CD8 α beta+ T cell accumulation within the small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:10122-27.
- Stenstad H, Svensson M, Cucak H, Kotarsky K, Agace WW. Differential homing mechanisms regulate regionalized effector CD8 α beta+ T cell accumulation within the small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:10122-27.
- Sugimoto N, Oida T, Hirota K et al. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol* 2006;18:1197-209.
- Sun CM, Hall JA, Blank RB et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007;204:1775-85.

- Sun D, Qin Y, Chluba J, Epplen JT, Wekerle H. Suppression of experimentally induced autoimmune encephalomyelitis by cytolytic T-T cell interactions. *Nature* 1988;332:843-45.
- Sun D, Qin Y, Chluba J, Epplen JT, Wekerle H. Suppression of experimentally induced autoimmune encephalomyelitis by cytolytic T-T cell interactions. *Nature* 1988;332:843-45.
- Svensson M, Marsal J, Ericsson A et al. CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alphabeta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J Clin Invest* 2002;110:1113-21.
- Svensson M, Johansson-Lindbom B, Zapata F et al. Retinoic acid receptor signaling levels and antigen dose regulate gut homing receptor expression on CD8+ T cells. *Mucosal Immunol* 2008;1:38-48.
- Takahashi I, Kiyono H, Hamada S. CD4+ T-cell population mediates development of inflammatory bowel disease in T-cell receptor alpha chain-deficient mice. *Gastroenterology* 1997;112:1876-86.
- Tang Q, Henriksen KJ, Bi M et al. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004;199:1455-65.
- Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 2008;9:239-44.
- Telega GW, Baumgart DC, Carding SR. Uptake and presentation of antigen to T cells by primary colonic epithelial cells in normal and diseased states. *Gastroenterology* 2000;119:1548-59.
- Tennakoon DK, Mehta RS, Ortega SB, Bhoj V, Racke MK, Karandikar NJ. Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 2006;176:7119-29.
- Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287-96.
- Toms C, Jessup H, Thompson C, Baban D, Davies K, Powrie F. Gpr83 expression is not required for the maintenance of intestinal immune homeostasis and regulation of T-cell-dependent colitis. *Immunology* 2008;125:302-12.
- Torres MI, Lopez-Casado MA, Lorite P, Rios A. Tryptophan metabolism and indoleamine 2,3-dioxygenase expression in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 2007;148:419-24.
- Travis MA, Reizis B, Melton AC et al. Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* 2007;449:361-65.
- Uhlig HH, Coombes J, Mottet C et al. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 2006;177:5852-60.
- Ukena SN, Westendorf AM, Hansen W et al. The host response to the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917: specific up-regulation of the proinflammatory chemokine MCP-1. *BMC Med Genet* 2005;6:43.
- Ukena SN, Singh A, Dringenberg U et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One* 2007;2:e1308.

- Uss E, Rowshani AT, Hooibrink B, Lardy NM, van Lier RA, ten Berge IJ. CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8⁺ T cells. *J Immunol* 2006;177:2775-83.
- van Driel IR, Ang DK. Role of regulatory T cells in gastrointestinal inflammatory disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:171-77.
- van Ginkel FW, Wahl SM, Kearney JF et al. Partial IgA-deficiency with increased Th2-type cytokines in TGF-beta 1 knockout mice. *J Immunol* 1999;163:1951-57.
- Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 2008;453:106-9.
- Vezyz V, Olson S, Lefrancois L. Expression of intestine-specific antigen reveals novel pathways of CD8 T cell tolerance induction. *Immunity* 2000;12:505-14.
- Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008;8:523-32.
- Voedisch S, Koenecke C, David S et al. Mesenteric lymph nodes confine dendritic cell-mediated dissemination of Salmonella enterica serovar Typhimurium and limit systemic disease in mice. *Infect Immun* 2009;77:3170-3180.
- von BH. Oral tolerance: is it all retinoic acid? *J Exp Med* 2007;204:1737-39.
- Wan YY, Flavell RA. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5126-31.
- Wang J, Huizinga TW, Toes RE. De novo generation and enhanced suppression of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by retinoic acid. *J Immunol* 2009;183:4119-26.
- Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006;24:677-88.
- Westendorf AM, Templin M, Geffers R et al. CD4⁺ T cell mediated intestinal immunity: chronic inflammation versus immune regulation. *Gut* 2005;54:60-69.
- Westendorf AM, Bruder D, Hansen W, Buer J. Intestinal epithelial antigen induces CD4⁺ T cells with regulatory phenotype in a transgenic autoimmune mouse model. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1072:401-6.
- Westendorf AM, Fleissner D, Deppenmeier S et al. Autoimmune-mediated intestinal inflammation-impact and regulation of antigen-specific CD8⁺ T cells. *Gastroenterology* 2006;131:510-524.
- Westendorf AM, Fleissner D, Groebe L et al. CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell expansion induced by antigen-driven interaction with intestinal epithelial cells independent of local dendritic cells. *Gut* 2009;58:211-19.
- Westendorf AM, Fleissner D, Hansen W, Buer J. T cells, dendritic cells and epithelial cells in intestinal homeostasis. *Int J Med Microbiol* 2010;300:11-18.
- Wolf AM, Wolf D, Rumpold H et al. Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease. *Clin Immunol* 2004;113:47-55.

- Wolvers DA, Coenen-de Roo CJ, Mebius RE et al. Intranasally induced immunological tolerance is determined by characteristics of the draining lymph nodes: studies with OVA and human cartilage gp-39. *J Immunol* 1999;162:1994-98.
- Worbs T, Bode U, Yan S et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 2006;203:519-27.
- Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DA. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:2603-22.
- Xystrakis E, Dejean AS, Bernard I et al. Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* 2004;104:3294-301.
- Yang XO, Pappu BP, Nurieva R et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 2008;28:29-39.
- Yu QT, Saruta M, Avanesyan A, Fleshner PR, Banham AH, Papadakis KA. Expression and functional characterization of FOXP3+ CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:191-99.
- Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol* 2001;167:4245-53.
- Zheng Y, Manzotti CN, Burke F et al. Acquisition of suppressive function by activated human CD4+. *J Immunol* 2008;181:1683-91.
- Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006;24:209-26.
- Zitvogel L. Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *J Exp Med* 2002;195:F9-14.

VERZEICHNISSE

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A20	Tnfaip3, engl. <i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3</i>
A2AR	Adenosin-Rezeptor 2A
Abb.	Abbildung
APC	
(Farbstoff)	Allophycocyanin
APC	
(Zelltyp)	Antigenpräsentierende Zelle, engl. <i>antigen presenting cell</i>
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonohosphat
CCL4	engl. <i>chemokine (C-C motif) ligand 4</i>
CD	Differenzierungs- <i>cluster</i>
Cdk6	engl. <i>cyclin-dependent kinase 6</i>
cDNA	komplementäre oder Kopie-DNA
CEDE	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CTL	<i>cytotoxic CD8+ T lymphocytes</i>
CTLA-4	engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
Cxcr6	engl. <i>chemokine (C-X-C motif) receptor 6</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DC	Dendritische Zelle, engl. <i>dendritic cell</i>
DEC205	Ly75, engl. <i>lymphocyte antigen 75</i>
DEP-1	Ptprj, engl. <i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, J</i>
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNase	Deoxyribonuclease
DNFB	1-fluoro-2,4-dinitrobenzene
dNTP	Deoxy-Nukleotid-Triphosphate
Dusp4	engl. <i>dual specificity phosphatase 4</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	engl. <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
engl.	englisch
et al.	et altera, lat. <i>und andere</i>

	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FACS	
FCS	Fötales Kälberserum, engl. <i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	engl. <i>forkhead box protein P3</i>
	Darm-assoziiertes lymphoides Gewebe, engl. <i>gut-associated lymphoid tissue</i>
GALT	
GATA-3	engl. <i>GATA-binding protein 3</i>
GFP	engl. <i>green fluorescence protein</i>
GITR	Tnfrsf18, engl. <i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18</i>
Gpr83	engl. <i>G protein-coupled receptor 83</i>
H ₂ O	Wasser
HA	Hemagglutinin
HCl	Chlorwasserstoff
HEV	engl. <i>high endothelial venules</i>
HLA-E	Humanes Leukozyten Antigen E
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenase
IEC	intestinale Epithelzellen, engl. <i>intestinal epithelial cell</i>
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFN- γ ,	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILFs	isolierte lymphoide Follikel, engl. <i>isolated lymphoid follicle</i>
IPEX-	
Syndrom	Immundysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked Syndrom
iTregs	induzierte Tregs
IVC	Individuell ventilierter Käfig, engl. <i>individual ventilated cage</i>
LAG3	engl. <i>lymphocyte-activation gene 3</i>
lat.	lateinisch
LIGHT	Tnfsf14, engl. <i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14</i>
LP	Lamina propria
LPL	Lamina propria Lymphozyten
Ly-6c	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus C</i>

MACS	engl. <i>magnetic cell separation</i> engl. <i>avian musculoaponeurotic fibrosarcoma (v-maf) AS42 oncogene</i>
Maf	<i>homolog</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
	Haupthistokompatibilitäts-Klasse I- oder II- Moleküle, engl. <i>major</i>
MHC	<i>histocompatibility complex</i>
min	Minuten
MLN	Mesenterische Lymphknoten
M-Zellen	Mikrofaltenzellen
NKT-	
Zellen	natürliche Killer T-Zellen
NKT-	
Zellen	natürliche Killer T-Zellen
NK-Zellen	natürlichen Killerzellen
nTregs	natürliche Tregs
OX40	Tnfrsf4, engl. <i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4</i>
PB	Pacific Blue
PBL	peripheral blood lymphocytes
	Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut, engl. <i>peripheral blood</i>
PBMC	<i>mononuclear cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cy5
Pim2	engl. <i>proviral integration site 2</i>
Plekho1	engl. <i>pleckstrin homology domain containing, family O member 1</i>
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
Pou2af1	engl. <i>POU domain, class 2, associating factor 1</i>
PP	Peyer'sche Platten
RA	Retinsäure, engl. <i>retinoic acid</i>
RANTES	Ccl5, engl. <i>chemokine (C-C motif) ligand 5</i>
Rasgrp2	engl. <i>RAS, guanyl releasing protein 2</i>
Rgs1	engl. <i>regulator of G-protein signaling 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROR	engl. <i>RAR-related orphan receptor</i>

RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
Socs2	engl. <i>suppressor of cytokine signaling 2</i>
Tab.	Tabelle
T-bet	engl. <i>T-box transcription factor expressed in T cells</i>
Tcf7	engl. <i>transcription factor 7, T-cell specific</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor, engl. <i>T cell receptor</i>
TGF- β	engl. <i>transforming growth factor β</i>
T _H -Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR	engl. <i>toll like receptors</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tnfrsf9	engl. <i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9</i>
Treg	regulatorische T-Zelle
Trib1	engl. <i>tribbles homolog 1</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T _s	suppressive T-Zellen
TSLP	thymisches stromales Lymphopoietin
Upm	Umdrehungen pro Minute

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Das intestinale Immunsystem.	14
Abb. 1-2:	Immunreaktionen in der intestinalen Mukosa.	17
Abb. 1-3:	Mechanismen zur Aufrechterhaltung eines tolerogenen Milieus in der intestinalen Mukosa.	25
Abb. 1-4:	Chronische Antigenpräsentation im Darm führt zur Induktion von antigen-spezifischen CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ und CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen.	30
Abb. 1-5:	Verschiedene Modelle Treg-vermittelter Suppression.	35
Abb. 2-1:	Primerpaar der DNA Methylierungsanalyse mit TAG Sequenz und Auszug aus der Sequenz des <i>foxp3</i> Promotors.	46
Abb. 3-1:	Aktivierung von naiven HA-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen durch Ko-Kultivierung mit DCs aus den MLN von VILLIN-HA transgenen Mäusen.	59
Abb. 3-2:	Photographische Darstellung des Mesenteriums vor (+MLN) und nach der operativen Resektion der MLN (-MLN) in Mäusen.	60
Abb. 3-3:	Rolle der MLN bei der CD8 ⁺ T-Zell-vermittelten intestinalen Entzündung in VILLIN-HA transgenen Mäusen.	61
Abb. 3-4:	Aktivierung HA-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen in den mesenterischen Lymphknoten und Peyer'schen Platten von VILLIN-HA transgenen Mäusen.	62
Abb. 3-5:	Aktivierung von naiven HA-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen durch Ko-Kultivierung mit DCs aus der Lamina propria von VILLIN-HA transgenen Mäusen.	64
Abb. 3-6:	CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen in der Peripherie im gesunden Individuum.	65
Abb. 3-7:	Periphere Induktion von HA-spezifischen CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgenen Mäusen.	67
Abb. 3-8:	Induktion von HA-spezifischen CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen durch MLN DCs <i>in vitro</i> .	68
Abb. 3-9:	TGF-β/RA vermittelte Induktion von HA-spezifischen CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i> .	69

Abb. 3-10:	TGF- β /RA-vermittelte Induktion von polyklonalen CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i> .	70
Abb. 3-11:	Durchflusszytometrische Sortierung von TGF- β /RA-behandelten CD8 ⁺ T-Zellen in CD8 ⁺ Foxp3 ⁻ /GFP ⁻ und CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ /GFP ⁺ T-Zellen.	71
Abb. 3-12:	Genexpressionsanalyse von TGF- β /RA-behandelten CD8 ⁺ Foxp3 ⁻ /GFP ⁻ und CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ /GFP ⁺ T-Zellen.	72
Abb. 3-13:	Expression von Treg-spezifischen Molekülen in TGF- β /RA-behandelten CD8 ⁺ Foxp3 ⁻ /GFP ⁻ und CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ /GFP ⁺ T-Zellen.	79
Abb. 3-14:	Expression von Treg-spezifischen Molekülen in TGF- β /RA-behandelten CD8 ⁺ Foxp3 ⁻ /GFP ⁻ und CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ /GFP ⁺ T-Zellen.	80
Abb. 3-15:	Expression von zytotoxischen CD8 ⁺ T-Zell-spezifischen Genen in TGF- β /RA-behandelten CD8 ⁺ Foxp3 ⁻ /GFP ⁻ und CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ /GFP ⁺ T-Zellen.	81
Abb. 3-16:	Expression von GzmB in TGF- β /RA-behandelten CD8 ⁺ Foxp3 ⁻ /GFP ⁻ und CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ /GFP ⁺ T-Zellen.	81
Abb. 3-17:	Expression von Darm-relevanten Migrationsmolekülen in TGF- β /RA-behandelten CD8 ⁺ Foxp3 ⁻ /GFP ⁻ und CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ /GFP ⁺ T-Zellen.	82
Abb. 3-18:	Methylierungsanalyse einer ausgewählten Region des <i>foxp3</i> Promotors von TGF- β /RA-induzierten CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ /GFP ⁺ T-Zellen.	83
Abb. 3-19:	Zytokinprofil von TGF- β /RA-behandelten CD8 ⁺ Foxp3 ⁻ /GFP ⁻ und CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ /GFP ⁺ T-Zellen.	85
Abb. 3-20:	Proliferation von TGF- β /RA-behandelten CD8 ⁺ Foxp3 ⁻ /GFP ⁻ und CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ /GFP ⁺ T-Zellen.	86
Abb. 3-21:	Immunsuppressives Potential von TGF- β /RA-induzierten CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ /GFP ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i> .	87
Abb. 3-22:	Zell-Zell-Kontakt-vermitteltes immunsuppressives Potential von TGF- β /RA-induzierten CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ /GFP ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i> .	88
Abb. 3-23:	Immunsuppressives Potential von TGF- β /RA-induzierten CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ /GFP ⁺ T-Zellen im Kontakthypersensibilitätsmodell	90

Abb. 3-24:	CD8 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen im peripheren Blut von Kolitis ulzerosa Patienten.	91
Abb. 3-25:	TGF-β/RA-vermittelte Induktion von humanen CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i> .	92
Abb. 3-26:	Expression von Treg-spezifischen Markermolekülen in TGF-β/RA-induzierten humanen CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen.	93
Abb. 3-27:	Immunsuppressives Potential von TGF-β/RA-induzierten humanen CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i> .	94

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1:	Oligonukleotidprimerpaare zur Detektion transgener Mäuse	41
Tab. 2-2:	PCR-Programm bei der Detektion transgener Mäuse.	42
Tab. 2-3:	Oligonukleotidprimerpaare zur quantitativen Expressionsanalyse von RPS9 und GzmB.	43
Tab. 2-4:	Programm der semiquantitativen PCR.	43
Tab. 2-5:	Programm der quantitativen Real-Time PCR.	44
Tab. 2-6:	<i>Touchdown</i> -PCR Programm bei der DNA-Methylierungsanalyse.	45
Tab. 2-7:	Verwendete Antikörper und Fluorophorkonjugate.	48
Tab. 2-8:	Morphologische Bewertung der Pathologie des Dünndarms anhand der angegebenen Parameter.	56
Tab. 3-1:	Funktionelle Kategorisierung ausgewählter, differentiell exprimierter Gene zwischen TGF- β /RA-behandelten CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ /GFP ⁺ und CD8 ⁺ Foxp3 ⁻ /GFP ⁻ T-Zellen.	72

ANHANG

10 Anlagen

Die Daten der Transkriptomanalyse von TGF- β /RA-behandelten CD8⁺Foxp3⁺/GFP⁺ und CD8⁺Foxp3⁻/GFP⁻ T-Zellen wurden in elektronischer Form auf einer CD (Compact Disc) beigefügt.

Einige der in der Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit verschiedenen Kooperationspartnern erzielt. Hierauf wird an entsprechender Stelle hingewiesen.

Publikationen und Tagungsbeiträge

Wissenschaftliche Publikationen

Fleissner, D.; Hansen, W.; Geffers, R.; Buer, J.; Westendorf, AM. (2010). Local induction of immunosuppressive CD8⁺ T cells in the gut-associated lymphoid tissues. PLoS One. 5(10):e15373.

Westendorf, AM.; Fleissner, D.; Groebe, L.; Jung, S.; Gruber, AD.; Hansen, W.; Buer, J. (2009). CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell expansion induced by antigen-driven interaction with intestinal epithelial cells independent of local dendritic cells. Gut. 58(2):211-9.

Westendorf, AM.; Fleissner, D.; Deppenmeier, S.; Gruber, AD.; Bruder, D.; Hansen, W.; Liblau, R.; Buer, J. (2006). Autoimmune-mediated intestinal inflammation-impact and regulation of antigen-specific CD8⁺ T cells. Gastroenterology. 131(2):510-24.

Übersichtsartikel

Westendorf, AM.; Fleissner, D.; Hansen, W.; Buer, J. (2010). T cells, dendritic cells and epithelial cells in intestinal homeostasis. Int J Med Microbiol. 300(1):11-8.

Eigene Tagungsbeiträge

Vorträge

Fleissner, D.; Hansen, W.; Langhorst, J.; Buer, J.; Westendorf, AM. Immunosuppressive CD8⁺Foxp3⁺ T cells in controlling intestinal homeostasis. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI). Leipzig. 2010.

Fleissner, D.; Buer, J.; Westendorf, AM. Intestinal Antigen Display Promotes the Peripheral Induction of Antigen-specific CD8⁺Foxp3⁺ T Cells. International Congress of Mucosal Immunology (ICMI). Boston, USA. 2009.

Fleissner, D.; Ahrendt, M.; Bode, U.; Buer, J.; Westendorf, AM. Aktivierung einer zytotoxischen CD8⁺ T-Zell-Antwort in der intestinalen Mukosa. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (DACHED). Mainz. 2008.

Poster Präsentationen

Fleissner, D.; Hansen, W.; Langhorst, J.; Buer, J.; Westendorf, AM. Immunosuppressive CD8⁺Foxp3⁺ T cells in controlling intestinal homeostasis. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI). Leipzig. 2010.

Fleissner, D.; Hansen, W.; Buer, J.; Westendorf, AM. Gut specific antigen expression leads to peripheral induction of antigen-specific CD8⁺Foxp3⁺ Tregs. Tag der Wissenschaft der medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Essen. 2009.

Fleissner, D.; Hansen, W.; Buer, J.; Westendorf, AM. Gut specific antigen expression leads to peripheral induction of antigen-specific CD8⁺Foxp3⁺Tregs. 2nd European Congress of Immunology. Berlin. 2009.

Fleissner, D.; Westendorf, AM. Induktion von CD8⁺ regulatorischen T-Zellen. Tag der Wissenschaft der medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Essen. 2008.

Fleissner, D.; Ahrendt, M.; Bode, U.; Buer, J.; Westendorf, AM. Initiation of cytotoxic epithelial-specific CD8⁺ T cell responses in the intestinal mucosa. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Immunologie (DGfI u ÖGAI). Wien. 2008.

Fleissner, D.; Jung, S.; Buer, J.; Westendorf, AM. Impact of mucosal dendritic cells in the induction of tolerance or pathology. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI). Heidelberg. 2007.

Fleissner, D.; Buer, J.; Westendorf, AM. Autoimmune mediated intestinal inflammation - impact and regulation of antigen specific CD8⁺ T cells. 3rd Spring School on Immunology der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI). Ettal. 2007.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Mechanismen zur Induktion von CD8⁺ T-Zell-vermittelter Toleranz und Immunität in der intestinalen Mukosa“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Diana Fleissner befürworte.

Essen, den _____

Unterschrift des wissenschaftlichen Betreuers/
Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Diana Fleissner

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Diana Fleissner